

Aus der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Herr Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ECVS/ACVS

Aus der Abteilung Musculoskeletal Research Unit
Leiterin: PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Biokompatibilität verschiedener Kompositionen als Knochenersatzstoffe
Eine Studie am Schaf

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Karolin Kühn
Tierärztin
aus Heidelberg (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. Hans Geyer, Korreferent

Zürich 2007

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	SUMMARY.....	6
3	EINLEITUNG	7
3.1	Biokompatibilität.....	7
3.1.1	Definition.....	7
3.1.2	Kriterien der Biokompatibilität.....	8
3.2	Knochentransplantate.....	8
3.3	Knochenersatzmaterialien.....	9
3.3.1	Kalziumphosphatzemente	10
3.3.2	Polymere.....	10
3.3.3	Kompositionen.....	11
3.4	Ziel der Studie.....	12
4	MATERIAL UND METHODEN	13
4.1	Aufbau der Studie	13
4.2	Biomaterialien.....	13
4.3	Tiere.....	14
4.4	Vorbereitung und Anästhesie.....	15
4.5	Operation	16
4.6	Postoperative Phase und weiterer Verlauf.....	17
4.7	Probengewinnung und Aufbereitung	17
4.8	Untersuchungsmethoden	18
4.8.1	Makroskopische Untersuchung	18
4.8.2	Radiologische und mikroradiologische Untersuchung.....	18

4.8.3	Histologische Untersuchung	19
4.8.4	Histomorphometrische Untersuchung	19
4.8.5	Statistik.....	20
5	ERGEBNISSE	21
5.1	Operation	21
5.1.1	Handhabung der Biomaterialien	21
5.2	Postoperative Phase und weiterer Verlauf.....	22
5.3	Makroskopische Ergebnisse	24
5.4	Radiologische Ergebnisse	24
5.5	Histologische Ergebnisse.....	25
5.5.1	Histomorphometrische Ergebnisse.....	25
5.5.1.1	Knochen.....	25
5.5.1.2	Bindegewebe	26
5.5.1.3	Biomaterial.....	26
5.5.2	Qualitative und semiquantitative Auswertung.....	28
5.5.2.1	Gruppe C1.....	28
5.5.2.2	Gruppe C2.....	29
5.5.2.3	Gruppe C3.....	29
5.5.2.4	Gruppe C4.....	29
5.5.2.5	Gruppe I1	29
5.5.2.6	Gruppe I2	29
5.5.2.7	Gruppe I3	30
5.5.2.8	Gruppe P1	30
5.5.2.9	Gruppe P2	30
5.5.2.10	Gruppe P3	30
5.5.2.11	Gruppe PF.....	30
5.5.3	Korrelationen.....	31
6	DISKUSSION	32
6.1	Versuchsmodell.....	32

6.2	Auswertungsmethoden.....	33
6.3	Ergebnisse	34
6.3.1	Operation	34
6.3.2	Postoperative Phase.....	34
6.3.3	Makroskopische Ergebnisse	35
6.3.4	Histologische Ergebnisse.....	35
6.4	Schlussfolgerung und Perspektiven.....	37
7	LITERATURVERZEICHNIS	38
8	ABKÜRZUNGEN	41
9	ANHANG	42
	DANKSAGUNG	49
	LEBENS LAUF	50

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden zehn verschiedene Zementformulierungen in verschiedenen Applikationsformen auf Biokompatibilität, Abbaurate, Osteokonduktivität, Osteointegration und Handhabung in einem Versuchsmodell an Schafen über den Zeitraum von acht Wochen untersucht.

Die verwendeten Kompositionen bestanden aus Polycaprolacton in unterschiedlichen Kombinationen mit β -Tricalziumsulfat und chronOSTM. Zwei Gruppen beinhalteten Bariumsulfat oder Strontiumcarbonat als Kontrastmittel. Als Kontrollen wurden Polymethylmethacrylat (PMMA) und chronOSTM verwendet.

Die Studie wurde an acht Schweizer Alpenschafen anhand eines Bohrlochmodells durchgeführt. Die acht Millimeter dicken Bohrlochdefekte wurden an proximaler Epiphyse und distaler Metaphyse an Humerus und Femur gesetzt. Acht Wochen nach der Operation wurden die Tiere geschlachtet und die beteiligten Knochenproben entnommen. Die Proben wurden einer makroskopischen, radiologischen, histologischen und histomorphometrischen Untersuchung unterzogen.

Bis auf eine zeigten alle untersuchten Gruppen eine gute Biokompatibilität. Bei der Gruppe I3 (70% Polymer, 30% Strontiumcarbonat) muss die Biokompatibilität in Frage gestellt werden. In der Handhabung waren alle Gruppen zufrieden stellend. Vier Gruppen unterschiedlicher Applikationsformen (C1, I2, I3, und P2) fielen als besonders benutzerfreundlich auf.

2 Summary

Synthetic bone substitutes have their firm place in orthopedic and trauma surgery and have gained further popularity through novel (bio)degradable polymers. The requirements for these biomaterials may vary according to clinical indications, but good biocompatibility, absence of toxicity and mechanical integrity are among them. In the best of cases, bone substitutes reveal also properties such as high osteoconductivity, -inductivity and resorption behavior according to the desired duration until bone replacement took place. Furthermore, the bone substitutes need to be practical and easy to apply for the orthopedic surgeon.

The experimental animal study was conducted on 8 Swiss Alpine sheep, where an established drill hole model in long bones was chosen to test the various bone graft substitutes. Briefly, the 11 different materials were injected into a drill hole in the proximal and distal epiphysis and metaphysis of the humerus and femur, whereby 7 of the implants served as test and the other 4 as control materials.

All implants tested fulfilled the biological requirements of biocompatibility within tissue and ease of surgical application. However, there were minimal differences between the groups, such that group I3 showed a slightly higher tendency compared to the other groups for provoking a foreign body response that may require further investigations. Although all of them were easy to handle, surgical application of the implants was favorable in groups C1, I2, I3 and P2.

3 Einleitung

Knochenersatzmaterialien werden an Mensch und Tier schon längere Zeit eingesetzt. Im Jahre 1907 wurde der erfolgreiche Ersatz einer einseitig exartikulierten Mandibula eines Menschen durch Elfenbein beschrieben¹. Biomaterialien als Knochenersatzstoffe finden zahlreiche klinische Anwendungsgebiete, z. B. in der Unfallchirurgie oder in der Orthopädie. Beispiele dafür sind Endoprothesen, Vertebroplastiken, die Defektauffüllung nach Tumorexzision oder die Überbrückung von Frakturen².

Autogene Knochentransplantate besitzen sehr gute osteogenetische, osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften und sind bisher das Mittel der Wahl. Jedoch sind sie nur begrenzt verfügbar und müssen durch einen schmerzhaften Zweiteingriff, der eine verlängerte Operationszeit erfordert, gewonnen werden. Weiterhin nachteilig sind eventuell auftretende Komplikationen des Zweiteingriffs, wie Infektionen oder die Gefahr einer Fraktur.

Aufgrund dieser Nachteile wird schon lange nach alternativen Knochenersatzstoffen gesucht. Der optimale Knochenersatz für die jeweilige Indikation sollte nicht nur einen einfachen Ersatz des körpereigenen Gewebes darstellen, sondern es wird versucht Menge und Qualität des neu gebildeten Knochens, die Zeiteinheit der Knochenneubildung und –heilung, sowie die mechanische Belastbarkeit zu beeinflussen³. Wichtige Themen beim Einsatz von Knochenersatzstoffen sind die biologische Eigenpotenz, d.h. osteoinduktive, osteogenetische, osteokonduktive Wirkung, die Toxizität, die Sterilität, sowie immunologische und auch kanzerogene Reaktionen des Körpers auf die fremde Substanz. Außerdem sollte für den Chirurgen eine einfache Anwendung und freie Wahl in Form und Größe bei niedrigen Kosten gewährleistet sein^{4,5}. In der vorliegenden Studie sollten vor allem Biokompatibilität, Bioaktivität und die Handhabung von Knochenzementen betrachtet werden.

3.1 Biokompatibilität

3.1.1 Definition

„Das Biomaterial darf das biologische System nicht beeinträchtigen. Es soll seine Funktion im biologischen Milieu über einen mehr oder weniger langen Zeitraum erfüllen, ohne dabei das Gewebe, mit dem es in Kontakt steht, zu schädigen“⁶.

3.1.2 Kriterien der Biokompatibilität

Kriterien für die Biokompatibilität eines Materials sind die Wechselwirkungen zwischen Implantat und Körper. Die Interaktion kann auf biochemischem wie auf zellulärem Niveau stattfinden. Als erstes findet eine Reaktion des Gewebes mit der Materialoberfläche in Form von Adsorption von Proteinen statt. Diese Proteine ziehen Zellen an, welche

- a) bei der Integration des Implantates in die Umgebung hilfreich sein können oder
- b) eine fibröse Kapsel um das Implantat bilden können, um es vom Körper abzuschotten.

Im Falle a) spricht man von einem biokompatiblen Material. Dieses Material kann ebenso bioaktiv sein, im besten Fall durchdringen die Zellen das Implantat und die Grenzen zwischen Implantat und Körpergewebe verschwinden⁷.

Im Falle b) kann es zur chronischen Entzündung, Bildung eines Granuloms oder zur Nekrose des umliegenden Gewebes kommen. Beteiligte Zellen sind Makrophagen, Plasmazellen, Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen⁶. Die Bildung von Bindegewebe kann nicht eindeutig als negatives Geschehen beurteilt werden. Einige Autoren sehen die Bildung der bindegewebigen Kapsel als Teil eines dynamischen Prozesses und als Antwort auf die Einführung eines fremden Materials im Körper^{8,9}. Ursache dafür sind Irritation und kleine Traumata aufgrund von Mikrobewegungen (micromotion), die vorkommen können, obwohl das Material chemisch inert, nicht toxisch und nicht immunogen ist.⁹⁻¹³

Eine weitere Definition von Biokompatibilität lautet: „Akzeptanz eines Implantats von umgebenden Gewebe und dem Körper als Ganzes.“⁷ Diese Definition beinhaltet ebenso toxische, immunologische und kanzerogene Reaktionen des Implantats⁴.

Die Biokompatibilität kann anhand von Entzündungsanzeichen, Bildung einer fibrösen Kapsel und Zellreaktionen bewertet werden¹². Die Zellreaktionen finden nahe der Implantatoberfläche statt¹². Punkte von primärem Interesse sind Anzahl von Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und die Einsprossung von Gefäßen¹⁴.

3.2 Knochentransplantate

Bei Knochentransplantaten unterteilt man in Autograft, Allograft und Xenograft.

Als Autograft bezeichnet man Gewebe oder ein Organ, welches von einer Stelle des Körpers an eine andere Stelle desselben Körpers verpflanzt wird⁷. Je nach Herkunft spricht man von aspiriertem Knochenmark, spongiossem oder kortikalem Transplantat^{15,16}.

Ein Transplantat, das von unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies stammt, nennt man Allograft⁷. Das allogene Implantat besitzt ebenso wie ein Autograft gute osteokonduktive, osteoinduktive und osteogenetische Eigenschaften, jedoch kann es zu einer

immunogenen Fremdkörperreaktion kommen, die eine Verzögerung der Einheilung mit sich bringt¹⁷⁻¹⁹. Der allogene Knochen wird nicht an den Stoffwechsel des Empfängerorganismus angeschlossen, wie es beim autologen Knochen der Fall ist²⁰. Daraus kann ein avitales Implantat resultieren, das nach Resorption seine Platzhalterfunktion verliert.

1988 berichtete das Center for Disease Control (CDC) über den ersten durch ein kryokonserviertes, allogenes Knochentransplantat infizierten HIV-Patienten²¹. Dieses Ereignis und andere, wie die Übertragung von Creutzfeldt-Jakob, Hepatitis B und C oder Tollwut schärften das Bewusstsein für die Gefahr der Übertragung von Krankheiten, so dass der Gebrauch von allogenen Transplantaten drastisch zurückging²¹⁻²⁴.

Ein Xenograft ist ein transplantiertes Organ oder Gewebe, das von einer Spezies auf eine andere übertragen wird⁷. Xenogene Transplantate zeigen gute osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften^{25,26}. Um die Immunantwort auf das fremde Material abzuschwächen, wird der verwendete Knochen entfettet und deproteiniert²⁷. Versuche mit demineralisierter Knochenmatrix zeigten eine hohe Osteoinduktivität und geringe Antigenität²⁸.

3.3 Knochenersatzmaterialien

Rueger unterscheidet in seiner modifizierten Klassifikation von Knochenersatzmitteln folgende vier Gruppen²:

- I. Biologische, organische Materialien
- II. Synthetische, anorganische Materialien
- III. Synthetische, organische Materialien
- IV. Kompositionen

Gruppe I beinhaltet alle Knochenmatrixextrakte, -fraktionen und auch Wachstumsfaktoren, die aus der organischen Phase des Knochengewebes gewonnen werden.

In Gruppe II werden Kalziumphosphatkeramiken unterschiedlicher Stöchiometrie zusammengefasst.

Gruppe III stellt organische Polymere und deren Kombinationen dar.

Gruppe IV erfasst alle Kombinationen der Substanzen der Gruppen I-III².

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Materialien gehören den Gruppen II (Gruppe C3, Chronos), III (Gruppe C2, PMMA; Gruppe C4, 100% Polymer) und IV (alle übrigen) an.

3.3.1 Kalziumphosphatzemente

Kalziumphosphatzemente werden seit den achtziger Jahren eingesetzt²⁹. Sie bestehen meist aus einer oder mehreren Pulverkomponenten und einer wässrigen Komponente, die nach Zusammenmischen reagieren und bei Erreichen der geeigneten Viskosität per Hand oder per Injektionspistole eingebracht werden können³⁰. Bei der Abbindereaktion entstehen, abhängig von der Ausgangssubstanz, dem pH-Wert, der Temperatur und der Partikelgröße, verschiedene Endprodukte wie Hydroxylapatit oder Brushite (Dicalziumphosphat-Dihydrat)³¹⁻³³. Das ausgehärtete Material besteht dann aus einer Mischung von neu gebildetem Sedimentationsprodukt und Ausgangssubstanz. Die Festigkeit ergibt sich aus der Verfilzung der sich bildenden Kristallite³⁴. Die Viskosität lässt sich über Zusätze wie z.B. Glycerin oder Polyethylenglycol regulieren. Die Abbindereaktion kann man durch Zugabe von z.B. Dinatriumhydrogenphosphat oder Veränderung des Flüssigkeitsanteiles beeinflussen^{35,36}. Kalziumphosphatzemente besitzen eine sehr gute Biokompatibilität, Osteokonduktivität und werden momentan eifrig erforscht³⁷. Sie sind injizierbar, in Form von Blöcken oder als Granulat erhältlich. Ein lange umstrittener Punkt ist die Porengröße, die eine Keramik besitzen soll. Man unterscheidet in Porosität, Mikro- und Makroporosität, wobei erstere in Volumen-%, die anderen in μm angegeben werden³⁸. Entscheidend sind dabei nicht nur die Größe, sondern auch die Anordnung der Poren, sowie deren Verbindungen untereinander. Die in der Literatur angegebenen Werte variieren zwischen 50 und 1000 μm ³⁹. Der Schwachpunkt von Kalziumphosphatzementen ist die mechanische Stabilität, so dass z.B. Frakturen zusätzlich mit einer Osteosyntheseplatte stabilisiert werden müssen⁴⁰. Es werden zahlreiche Versuche unternommen, die Zemente mit anderen Substanzen z. B. Polymeren zu verstärken. Die Schwerpunkte liegen auf der Optimierung der Biodegradation, der Viskosität und der Handhabung³².

3.3.2 Polymere

Seit den sechziger Jahren werden viele medizinische Produkte aus Polymeren hergestellt⁴¹. Beispiele dafür sind Spritzen, Katheter, Nahtmaterialien, Kontaktlinsen oder orthopädische Implantate. Sie entstehen durch Ringöffnungspolymerisation aus den jeweiligen Monomeren⁴². Große Vorteile beim Einsatz von Polymeren sind die einfache und günstige Herstellung verschiedener Formen, sowie der steuerbare Einfluss auf physikalische und mechanische Eigenschaften, die von der chemischen Struktur und beigefügten Zusätzen abhängen⁴³. Des Weiteren besitzen sie eine gute Biokompatibilität, haben einen niedrigen

Verschleiß und eine hohe Festigkeit. Ihre chemische und physikalische Widerstandskraft macht es leicht, sie zu sterilisieren. Ein anderer Vorteil ist die Elastizität bei ausreichender Stabilität, die der Festigkeit des Knochens ähnlich ist und keinen zu großen mechanischen Stress auf die Umgebung erlaubt⁴³. Ein zu starres Implantat könnte Folgefrakturen benachbarter Stellen oder Wirbel zur Folge haben.

Das erste in der orthopädischen Chirurgie erfolgreich eingesetzte Polymer ist Polymethylmethacrylat (PMMA) mit einer 90%-igen Erfolgsrate noch 15 Jahre nach Implantation^{44,45}. Der acrylische Zement erlaubt eine sofortige stabile Fixierung von Endoprothesen im Knochen⁴³. Ein Schwachpunkt beim Einsatz von PMMA ist die Osteointegration des Implantates (bone-cement interface), die durch das Einbringen anderer Materialien verbessert werden soll⁴⁶. Des Weiteren kann sich der Zement nach abgeschlossener Reaktion zusammenziehen, so dass es zu Instabilität kommen kann.

Befürchtungen beim Einsatz von Polymeren sind die Freisetzung toxischer Monomere oder Abbauprodukte und die Schädigung durch die bei der Polymerisation freigesetzte Wärme, die eine Nekrose des Knochens zur Folge haben könnte⁷.

Polymere können auch als Trägersubstanz für Medikamente verwendet werden. Auf diese Weise kann das Medikament kontrolliert über einen gewissen Zeitraum freigesetzt werden. Dadurch kann am Wirkort eine höhere Konzentration erreicht werden, als in gesunden Regionen, was vor allem bei der Krebstherapie von großem Vorteil sein kann⁴⁷. Ein anderes Beispiel sind auf Polycaprolactonen basierende Implantate zur Empfängnisverhütung⁴⁸.

3.3.3 Kompositionen

Da die einzelnen Materialien nicht alle Eigenschaften des optimalen Knochenersatzes mit sich bringen, wird an aus mehreren Komponenten bestehendem Zement geforscht, mit dem Ziel die erwünschten Eigenschaften in einer Komposition zu vereinen⁴⁹. So bringt z.B. PMMA eine exzellente Biokompatibilität mit sich, doch die bioaktiven Eigenschaften, wie die Osteointegration sollten verbessert werden⁴⁵. Der Gedanke, dieses Material mit einem bioaktiven z.B. Hydroxylapatit zu kombinieren und somit ein Material zu schaffen, das die Eigenschaften der Komponenten vereint, ein so genanntes „third generation biomedical material“, liegt nahe^{46,50}.

Der kortikale Knochen entspricht in seiner Ultrastruktur in etwa einer mit Hydroxyapatit verstärkten Komposition. Das natürliche Gewebe besitzt die Eigenschaften, die das analoge Material bereitstellen sollte; das optimale Material könnte also aus einem Polymer verbunden mit einer bioaktiven zweiten Phase bestehen⁵¹.

Kompositionen bestehen meist aus zwei Phasen, einer Hauptkomponente, welche die Matrix darstellt und einer Phase, die verstärkende Elemente einbringen soll. Über die zweite Phase besteht auch die Möglichkeit, ein Kontrastmittel einzubringen, indem man Stoffe wie Bariumsulfat verwendet⁴⁹.

Eine Einteilung der Knochenersatzmittel unterscheidet resorbierbare, teilweise resorbierbare und nicht resorbierbare Materialien, die miteinander kombiniert werden können⁴⁹. Die Implantate sollen im Körper eine zeitlich begrenzte Aufgabe übernehmen, ihr Abbau sollte also nach Erfüllung der Funktion möglich sein. Der Abbau und die Knochenneubildung sollten zeitlich synchron verlaufen⁵².

3.4 Ziel der Studie

In der vorliegenden Studie sollten verschiedene Komposite auf Biokompatibilität, Abbaurate, Osteokonduktivität, Osteointegration und Handhabung im Vergleich zu bisher verwendeten Biomaterialien getestet werden. Weiterhin sollten die Auswirkungen von Kontrastmittel, sowie deren radiologische Nachweisbarkeit untersucht werden. Dabei wurde die Hypothese erstellt, dass die angewandten Biomaterialien biokompatibel sind und durch Kombination verschiedener Materialien besser an das klinische Einsatzgebiet angepasst werden können. Zum Beispiel wird Polycaprolacton im Vergleich zu β -TCP sehr langsam resorbiert. Aus einer Kombination dieser beiden Komponenten erhofft man sich, dass sich der Knochen im Bereich der schneller resorbierbaren Komponente zuerst bildet und dieses Kallusgewebe die Osteointegration und die Stabilität erhöht und dennoch eine ausreichende Elastizität beibehalten wird. Die Kontrastmittel sollten keinen negativen Einfluss auf die Biokompatibilität ausüben und über den Zeitraum von mindestens zwei Monaten nachweisbar sein.

4 Material und Methoden

4.1 Aufbau der Studie

Die experimentelle Studie wurde an acht Schweizer Alpenschafen durchgeführt. Als Versuchsmodell diente das „Drill hole model“, bei dem jedem Tier insgesamt acht Bohrlochdefekte gesetzt werden⁵³. Als Lokalisationen wurden Humerus und Femur proximal wie auch distal auf beiden Seiten gewählt (Abb. 1-4). Die Defekte wurden mit elf verschiedenen Zementformulierungen aufgefüllt, wobei vier Gruppen als Kontrolle dienten. Röntgenaufnahmen wurden jeweils zu den Zeitpunkten unmittelbar post OP und 1 Woche post OP durchgeführt. Acht Wochen post OP wurden die Tiere geschlachtet, die beteiligten Knochen gewonnen, makroskopisch beurteilt, erneut geröntgt und mit der histologischen Aufarbeitung der entscheidenden Stellen begonnen.

4.2 Biomaterialien

Es wurden elf verschiedene Gruppen eingesetzt, davon waren vier bereits bekannte Kontrollen (C1-C4). Die Zusammensetzung der Gruppen wird in Tabelle 1 dargestellt. Die Gruppen I1, I2, I3 wurden mit speziellen Injektionspistolen appliziert (Abb. 5). Die Gruppen P1, P2 und P3 waren Kugeln von ca. 1,5 cm Durchmesser (Putties, Abb. 6), die nach Anwärmen in einem sterilen Wasserbad (Abb. 7) mit Ringerlösung formbar wurden und direkt in den Defekt eingesetzt werden konnten. Das Wasserbad musste zuvor auf eine gewisse Temperatur gebracht werden. Um eine sichere Zuteilung des richtigen Implantats zu ermöglichen, wurden sie innerhalb des Wasserbades in sterilen, beschrifteten Gläsern aufbewahrt. Die Gruppe C4 waren formbare zylindrische Stäbchen, die ohne Anwärmen eingesetzt werden konnten. Die Implantate der Gruppen PF waren vorgefertigte, nicht formbare zylindrische Stäbchen, die direkt in die Defekte eingesetzt wurden. Die Gruppe C2 wurde durch die dazu passende Injektionspistole (Stryker[®] Instruments, Limerick, Irland) injiziert, die Gruppe C3 in Granulatform (chronOS Granules, Synthes, Paoli, USA) (Abb. 8) eingebracht.

Gruppe	Zusammensetzung	Applikationsform
C1	100% Polymer	injizierbar
C2	PMMA	injizierbar
C3	chronOS Granulat	Granulat
C4	100% Polymer	putty
I1	70% Polymer, 30% beta-TCP	injizierbar
I2	70% Polymer, 30% Bariumsulfat	injizierbar
I3	70% Polymer, 30% Strontiumcarbonat	injizierbar
P1	70% chronOS (1,4-2mm), 30% Polymer	putty
P2	50% chronOS (0,5-1mm), 50% Polymer	putty
P3	60% chronOS (1,4-2mm)(0,5-1mm), 40% Polymer	putty
PF	65% Polymer, 35% chronOS (0,5-1mm)	preform

Tab. 1: Zusammensetzung der Gruppen

Lokalisation/Schaf	2520	2521	2522	2523	2524	2525	2526	2527
Prox Hum re	P1	I3	I1	C2	P3	C1	I2	C4
Dist Hum re	P2	C1	I2	C3	PF	I3	I1	P3
Prox Hum li	I1	C2	P3	P1	I3	PF	P2	C3
Dist Hum li	I2	C3	PF	P2	C1	P3	P1	C4
Prox Fem re	P3	P1	I3	I1	C2	I2	C3	PF
Dist Fem re	PF	P2	C1	I2	C3	I1	C2	C4
Prox Fem li	I3	I1	C2	P3	P1	P2	C1	C4
Dist Fem li	C1	I2	C3	PF	P2	P1	I3	C2

Tab. 2: Verteilung der Implantate

4.3 Tiere

Für den Versuch wurden acht adulte, männliche Weiße Alpenschafe im Alter von zwei bis drei Jahren, mit einem Gewicht von durchschnittlich 76 kg (71-82 kg) ausgesucht. Die Tiere unterliefen einem Herdenmanagement mit regelmäßigen Impfungen gegen Clostridien- und Pasteurelleninfektionen (Ovilis Heptavac P[®], Veterinaria AG, Zürich, Schweiz), der Befallssituation angepassten antiparasitären Behandlungen (zur Zeit: Triclabendazol und Levamisol per os; 1 ml/5kg, Endex 19,5%, Novartis AG, Basel, Schweiz; 0,25ml/25kg Ivermectin s.c., , Ivomec[®], Biokema, Crissier-Lausanne, Schweiz), Maedi-Visna-Kontrollen (Virologisches Institut, Tierspital Bern) und Klauenpflege. Zwei Wochen vor Beginn des Versuchs wurden die Tiere in einen näher gelegenen Stall verbracht, wo eine klinische

Untersuchung mit Herz- und Lungenauskultation, eine hämatologische Untersuchung, sowie eine chemische Blutuntersuchung durchgeführt wurden. Die Tiere wurden durch bestandseigene Ohrmarken und einem Mikrochip gekennzeichnet, zwei Tage vor der Operation gewogen und die Areale der Operationsstellen und die rechte Halsseite großzügig ausgeschoren. Die Schafe hungerten für 24h mit freiem Zugang zu Wasser.

4.4 Vorbereitung und Anästhesie

Am Operationstag wurden die Tiere nochmals klinisch untersucht, daraufhin mit Xylazin i.m. (0,1mg/kg, Rompun[®] 2%ige Lösung, Bayer Heath Care, Lyssach, Schweiz) und Buprenorphin i.m. (0,01g/kg, Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) sediert. Als venöser Zugang diente ein Verweilkatheter (Vygonüle S G14, Vygon GmbH, Aachen, Deutschland), der in die Vena jugularis gesetzt wurde. Die ausgeschorene Stelle wurde zuvor mit desinfizierender Seife (Hibiscrub, Zeneca AG, Luzern, Schweiz) gewaschen, mit 80%-igem Alkohol entfettet und mit Hibitane Tinktur (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) desinfiziert. Kurz vor Beginn der Operation erhielten die Tiere ein Antibiotikum in Form von Benzylpenizillin IV (30000 I.U./kg, Procain-Penicillin Streuli ad us. vet., G. Streuli&Co AG; Uznach, Schweiz) und Gentamicin IV (6 mg/kg; Vetagent[®] ad us. vet., Veterinaria AG, Zürich, Schweiz). Ein nicht steroidales Antiphlogistikum, Carprofen IV, (4 mg/kg; Rimadyl[®]; Pfizer, Vertrieb Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz), sowie Tetanusprophylaxe (3000 I.E./Tier, Tetanusserum Intervet ad us. vet.; Vertrieb Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) wurden ebenfalls verabreicht.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Ketamin IV (2 mg/kg; Narketan 10[®]; Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) in Kombination mit Diazepam IV (0,1 mg/kg; Valium[®]; Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz), zur Intubation erhielten die Schafe zusätzlich nach Bedarf Propofol IV (2-4 mg/kg, Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz). Die Tiere wurden mit Endotrachealtuben der Grössen 9-13 intubiert, der Kehlkopf zuvor mit einem Sprühstoß Lidocain (entsprechend ca. 10 mg, Xylocain[®] Spray, Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz) lokal betäubt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten sie 1-1,5% Isofluran (Forene[®]; Abbott AG, Baar, Schweiz) und Sauerstoff kombiniert mit Luft. Des Weiteren bekamen sie Infusion in Form von Ringer-Lösung (10ml/kg/h) über die gesamte Dauer der Operation.

Das Monitoring der Narkose erfolgte mit Hilfe von Pulsoxymetrie, Capnographie, EKG und Blutdruckmessung durch einen arteriellen Katheter im Ohr.

4.5 Operation

Die Schafe wurden zunächst auf der linken Seite gelagert, die Umgebung der Inzision nach standardisierter Vorgehensweise gewaschen, entfettet, desinfiziert und steril abgedeckt.

Von besonderer Wichtigkeit war die korrekte Lagerung des Tieres⁵³. Die Vordergliedmaße sollten in gebeugter Stellung parallel zum OP-Tisch und in stabiler Lage positioniert werden, um den Zugang und den korrekten Ansatz des Bohrers für das Bohrloch zu ermöglichen. Die oben liegende Hintergliedmaße sollte leicht gebeugt und für den Zugang zum proximalen Femur leicht abwärts geneigt sein.

Der Zugang erfolgte jeweils von lateral über einen 4-6 cm langen Hautschnitt, es folgte die Präparation der Weichteile bis auf den Knochen. Die Wunde wurde mit Hilfe von Wundspreizern offen gehalten, das Periost inzidiert und mittels eines Periostschabers retrahiert. Der 13 mm tiefe, zylindrische Bohrlochdefekt (Abb. 9) wurde mittels eines 8 mm Bohrers mit einer luftdruckbetriebenen Bohrmaschine (Synthes, Oberdorf, Schweiz) und einer Gewebeschutzhülse gesetzt (Abb. 10). Während des Bohrens wurde mit steriler Kochsalzlösung gespült. Das Bohrloch wurde mit einem Tupfer trocken gehalten, bis die jeweilige Zementformulierung eingebracht werden konnte (Abb. 11, 12).

Während der Operation wurde die Handhabung der Biomaterialien anhand von folgendem Schema vom Chirurgen bewertet:

Sehr gut	Gut	befriedigend
+++	++	+

Tab. 3: Bewertungsschema der Handhabung

Für die Bewertung ausschlaggebend waren die Aushärtungszeit, die Leichtigkeit der Applikation und die Möglichkeit eines defektfreien, retrograden Befüllens des Bohrlochs. Die Bohrlochdefekte wurden jeweils beidseits an Humerus und Femur proximal, wie auch distal gesetzt (Abb. 1-4). Die Schafe mussten intraoperativ gewendet und die zweite Seite erneut aseptisch vorbereitet werden.

Die jeweilige Lokalisation wurde durch einen Arterienligaturclip (Horizon™, Weck Closure Systems, USA), der als Marker diente, gekennzeichnet. Nach kurzem Trocknen und Aushärten des Zementes nutzte man zum Verschluss der Muskulatur und der Unterhaut einen resorbierbaren Faden (Vicryl® 2/0, Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgien). Die Haut wurde mit Klammern (Davis&Geck Appose ULC®, Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen,

Deutschland) verschlossen. Abschließend wurde die Wunde mit sterilen Tupfern abgedeckt, die ebenfalls mit Klammern befestigt wurden.

4.6 Postoperative Phase und weiterer Verlauf

Nach postoperativem Röntgen (Abb. 13) wurden die Tiere zurück in den Stall verbracht und erhielten nach der Aufwachphase wieder Wasser und Futter. Die Analgesie mittels Buprenorphin wurde für 12h aufrechterhalten, sowie Carprofen und Antibiose über 4 Tage verabreicht. Die Tupfer über der Operationsstelle konnten nach zwei Tagen entfernt werden. Nach einer Woche bekamen die Schafe erneut eine kurze Narkose nach dem oben beschriebenen Narkoseprotokoll, um Röntgenbilder aller betroffenen Stellen anfertigen zu können. Am 10. Tag konnten die Klammern entfernt werden.

Die Tiere wurden in den folgenden acht Wochen in kleinen Gruppen im Stall gehalten und täglich kontrolliert und klinisch untersucht.

4.7 Probengewinnung und Aufbereitung

Die Tiere wurden nach Ablauf der acht Wochen durch Bolzenschuss betäubt und durch Blutentzug getötet. Humerus und Femur wurden beidseits entnommen, fotografiert, beurteilt und in 2 Ebenen geröntgt (Faxitron X-Ray Systems, Hewlett Packard, Mc Minville Division, Oregon, USA). Die Implantatstellen wurden als ca. 2 cm³ große Würfel herausgesägt, erneut geröntgt und fotografiert und zur Fixierung in beschrifteten Gläsern mit Formalin für mindestens 7 Tage gelagert. Danach folgten die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) und die Entfettung in Xylol. Um ein ausreichendes Durchtränken der Proben zu gewährleisten, wurden sie ab diesem Zeitpunkt im Vakuum gelagert. Nach zweimaligem Wechseln des Xylols wurden sie in noch flüssiges Methylmetacrylat verbracht und bei 4°C für eine Woche lang infiltriert.

Die Herstellung des Methylmetacrylats erfolgte in einem Magnetrührer.

Methacrylsäuremethylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphtalat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) im Verhältnis 89.5: 10: 0.5 wurden für 15 Minuten gemischt und anschließend zusammen mit der gewonnenen Probe zur Polymerisation in luftdichte Teflonformen gegeben. Nach mehreren Tagen waren die Blöcke ausgehärtet, wurden mit Plastikaufsätzen beklebt (Historesinplastikkleber, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) und konnten den Teflonformen entnommen werden. Die neu beschrifteten Blöcke konnten nun zur Herstellung

der Dickschnitte in eine Sägevorrichtung (Präzisionsinnenlochsäge, Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) eingespannt werden. Es wurden Stücke von 300-400 µm geschnitten, gepresst, geröntgt (Faxitron X-ray Systems, Hewlett & Packard, Mc Minville Division, Oregon, USA) und hinterher mit Schnellkleber (Cementit® CA 12, Merz + Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf weiße Acropalträger aufgeklebt. Vor dem Färben wurden die Dickschnitte mittels einer Schleifmaschine (Planopol-V, Stuers A/S, Rodovre, Dänemark) auf eine Dicke von 40µm geschliffen. Es erfolgte eine Oberflächenfärbung mit Toluidinblau.

Die Blöcke wurden zur Herstellung der Dünnschnitte zunächst angeschliffen, um dann mittels Schnittmikrotom (Leica® RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) Schnitte von 5-7 µm zu schneiden. Diese wurden auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger gegeben, mit einer Kisolfolie bedeckt und im Wärmeschrank bei 42°C für zwei Tage gepresst und getrocknet. Je ein Dünnschnitt wurde mit Toluidinblau und einer mit van Kossa Färbung mit McNeals Tetrachrom Gegenfärbung gefärbt.

4.8 Untersuchungsmethoden

4.8.1 Makroskopische Untersuchung

Die gewonnenen Knochen wurden makroskopisch auf Veränderungen des umgebenden Weichteilgewebes untersucht. Nachdem dieses entfernt wurde, konnte das Bohrloch mit Implantat, sofern sichtbar ebenso makroskopisch auf Integration im Knochen und Veränderungen beurteilt werden. Die Implantate wurden mit einer Digitalkamera fotografiert.

4.8.2 Radiologische und mikroradiologische Untersuchung

Die Röntgenbilder, die direkt im Anschluss an die Operation angefertigt wurden, dienten der Überprüfung der Lokalisation des Bohrlochs, der Zementfüllung und der Röntgendichte des Implantats. Weitere Röntgenbilder wurden eine Woche post OP aufgenommen, um das Vorhandensein des Kontrastmittels zu überprüfen. Postmortal angefertigte Aufnahmen der Knochen in zwei Ebenen und die mikroradiologischen Aufnahmen der Dickschnitte (Abb. 14, 15) wurden auf Knochendichte, Knochenneubildung und weitere Veränderungen hin beurteilt.

4.8.3 Histologische Untersuchung

Bei der histologischen Untersuchung wurden die drei Gesichtsfelder (A, B, C) wie folgt gewählt (Abb. 16):

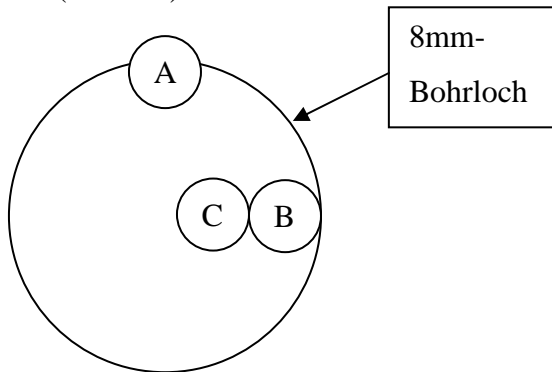


Abb. 16: Gesichtsfelder der histologischen Untersuchung

Score	0	1	2	3
Zellen/Gefäße	0	0-5	5-10	>10

Tab. 4: Zellen (außer Osteoklasten und Fremdkörper-Riesenzellen)

Score	0	1	2	3
Zellen	0	1-3	3-5	>5

Tab. 5: Osteoklasten/Fremdkörper-Riesenzellen

Die Dünnschnitte wurden semiquantitativ nach dem Scoring-System der Tabellen 4 und 5 bewertet. Es wurden drei für das Implantat repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt, Gesichtsfeld A am Übergang Knochen/Implantat, Gesichtsfeld B am Rand des Bohrlochs und Gesichtsfeld C im Inneren des Bohrlochs und im Anschluss an Gesichtsfeld B. Die Felder wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch begutachtet und auf für die Biokompatibilität ausschlaggebende Zellen untersucht. Dabei wurde die Präsenz von Makrophagen, Plasmazellen, Lymphozyten, Fremdkörperriesenzellen, Osteoklasten, sowie Endothelzellen bzw. die Häufigkeit von Gefäßen ausgewertet.

4.8.4 Histomorphometrische Untersuchung

Die Dickschnitte wurden durch ein Makroskop (Leica[®] M420, Leica-Microsystems, Glattbrugg, Schweiz) mit angeschlossener Digitalkamera bei achtfacher Vergrößerung abfotografiert und im Tiff-Format gespeichert (Abb. 17, 18). Die jeweiligen Komponenten

neu gebildete Knochenmatrix, Bindegewebe und Biomaterial konnten mit Hilfe von Adobe Photoshop in unterschiedlichen Farben angefärbt werden. Von einem Bildanalyseprogramm (Leica® QWin) konnten die Farben und somit die Zusammensetzung der Komponenten im 8mm-Bohrloch quantitativ gemessen werden. Die Werte wurden in Microsoft Excel in Prozentanteile umgerechnet.

4.8.5 Statistik

Die Statistik wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (SPSS® Base für Mac OS X, Version 13.0, Chicago, Illinois) erstellt. Zur Berechnung der Mittelwerte mit Standardabweichungen und der Unterschiede insgesamt wurde eine faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Post-hoc-Test nach Scheffe errechnet. Als statistisch signifikant wurden P-Werte $< 0,05$ angesehen. Die Ergebnisse wurden auf Korrelationen der jeweiligen Parameter untereinander untersucht.

5 Ergebnisse

5.1 Operation

Die Operation verlief bei allen Tieren komplikationslos, die Narkose wurde von allen Tieren gut toleriert. Um ein Fülldefizit zu vermeiden, wurden die Defekte bis einige mm (1-5mm) über den Kortex aufgefüllt. Die Abbindereaktion erfolgte bei allen Implantaten innerhalb weniger Minuten.

Bei den Schafen 2526 und 2527 bildete sich beim Bohren der jeweils letzten Löcher zwischen Bohrer und Gewebeschutzhülse eine schwarze schmierige Substanz bestehend aus Abreibpartikeln. Der Abrieb entstand durch eine Achsenabweichung von Bohrer und Gewebeschutzhülse. Der Defekt wurde damit jedoch nicht kontaminiert, da sich die Substanz oberhalb der Gewebeschutzhülse bildete und somit abgefangen werden konnte, bevor sie in den Wundbereich geriet. Der Bohrer wurde für die nächsten Operationen ausgetauscht.

5.1.1 Handhabung der Biomaterialien

Alle Implantate ließen sich ohne größere Schwierigkeiten einbringen. Bei den injizierbaren Implantaten wurden visköse Materialien bevorzugt, da sie sich leichter durch die Injektionspistole pressen ließen. Das Injizieren ermöglichte ein retrogrades Auffüllen der Defekte.

Bei den Putties wurde die kleinere und leichter formbare Variante P2 bevorzugt. Die sehr schnelle Aushärtungszeit der Gruppen P1 und P3 erschwerte ein Anpassen an die Defektform, die Implantate wurden dadurch schnell brüchig.

Bei der Gruppe PF wurde der Aufwand von Kraft beim Einbringen in eventuell fragiles Knochengewebe kritisiert.

Gruppe	Bewertung	Bemerkungen
I1	++	Gutes Auffüllen des Defektes; relativ schnelle Aushärtungszeit
I2	+++	Sehr leichtes Auffüllen des Defektes; weniger Widerstand beim Injizieren, als bei Gruppe I1; relativ schnelle Aushärtungszeit
I3	+++	Sehr leichtes Auffüllen des Defektes; weniger Widerstand beim Injizieren, als bei Gruppe I1; relativ schnelle Aushärtungszeit
P1	+	Schwieriges Anpassen des Putties an die Defektform und somit schwierigeres, komplettes Befüllen des Defektes; sehr schnelle Aushärtungszeit, was eine Korrektur der Form nur sehr kurze Zeit erlaubte
P2	+++	Bessere Formbarkeit, als Gruppen P1 und P3; dadurch leichteres Auffüllen des Defektes; relativ schnelle Aushärtungszeit
P3	+	Schwieriges Anpassen des Putties an die Defektform und somit schwierigeres, komplettes Befüllen des Defektes; sehr schnelle Aushärtungszeit, was eine Korrektur nur sehr kurze Zeit erlaubte
PF	+	Höherer Kraftaufwand beim Einbringen des vorgefertigten Stäbchens, als bei formbaren Implantaten; Abbrechen von kleinen Stücken
C1	+++	Sehr leichtes Auffüllen des Defektes; weniger Widerstand beim Injizieren, als bei den Gruppen I1 und I3 relativ schnelle Aushärtungszeit
C2	++	Leichtes Auffüllen des Defektes; mehr Widerstand beim Injizieren, als bei Gruppe C1
C3	++	Verwendung von Trichter, um das Granulat einzubringen; Anwendung zufrieden stellend
C4	++	Das längliche Putty ermöglichte ein leichtes Auffüllen des Defektes

Tab. 6: Bewertung der Handhabung

5.2 Postoperative Phase und weiterer Verlauf

Bei allen Schafen traten nach der Operation leichtgradige Umfangsvermehrungen in Form von Seromen im Bereich der Wunde auf, die jeweils nach 3-5 Tagen wieder verschwanden. Nur das Schaf 2527 zeigte sieben Tage post OP eine mittelgradige Lahmheit hinten links, die sich trotz der Gabe von Carprofen (4 mg/kg, 1xtgl. Rimadyl[®]; Pfizer, Vertrieb Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz) verschlechterte. Die Umgebung des Kniegelenks zeigte eine fluktuierende Umfangsvermehrung. Da die Temperatur leicht erhöht war, wurde das Antibiotikum Amoxicillin (0,05 ml/kg s.c., Clamoxyl[®], Pfizer AG, Zürich, Schweiz) gegeben. Da sich die Symptome nicht verbesserten, wurden Röntgenbilder angefertigt, um eine Fraktur auszuschließen. Daraufhin wurde das Tier mit Ketamin IV (2 mg/kg, Narketan 10[®], Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) narkotisiert, die Umfangsvermehrung nach Schur und standardisierter Reinigung und Desinfektion gespalten, eine bakteriologische und

zytologische Untersuchung der sich entleerenden Flüssigkeit eingeleitet, mit Chlorhexidinlösung gespült und eine Drainage in die Wundhöhle eingenäht. Auf die Wunde wurde eine sterile Kompresse (Mesorb[®], Mölnlycke Heath Care AB, Göteborg, Schweden) mit Klammern befestigt, das Bein wurde mit einem Verband versehen. Die Wunde wurde bis zur Abheilung alle 2-3 Tage, später nach Bedarf mit Chlorhexidinlösung gespült, gesäubert und neu abgedeckt.

Zehn Tage post OP war auch an der gegenüberliegenden Gliedmasse auf Kniehöhe eine fluktuierende Umfangsvermehrung zu erkennen. Diese wurde zunächst beobachtet, da sie sich aber weiterhin vergrößerte, wurde sie analog der anderen Seite gespalten und die Wundhöhle mit einer Drainage versehen. Nach drei Tagen konnte die Drainage gezogen werden, die weitere Abheilung erfolgte komplikationslos.

Das Schaf 2526 zeigte wenige Tage später die gleichen Symptome wie Schaf 2527, so dass die fluktuierende Schwellung am linken Knie ebenso gespalten und gespült wurde. Da es sich um eine kleinere Wundhöhle handelte, wurde auf eine Drainage verzichtet, die Wunde bis zum Zugranulieren offen gehalten, alle 2-3 Tage gespült, gesäubert und abgedeckt. Das Schaf erhielt bis zur Abheilung Amoxicillin (0,05 ml/kg s.c, Clamoxyl[®], Pfizer AG, Zürich, Schweiz).

Schaf 2523 zeigte 6 Wochen nach Beginn des Versuchs starke Koliksymptome, die nach einer Allgemeinuntersuchung und Sonographie auf eine Verlegung der Harnröhre zurückzuführen waren. In Harnblase und Harnröhre befanden sich kleinere Harnsteine. Nach Entfernen des Processus urethralis konnte das Tier zunächst wieder Harn absetzen, zwei Tage später blieb der Harnabsatz erneut aus und der Zustand des Tieres verschlechterte sich, so dass das Tier in Narkose gelegt wurde und über einen abdominalen Zugang ein Foley-Katheter eingenäht wurde. In den folgenden Tagen war der Zustand des Tieres stabil. Nach einer Woche trat Fieber auf, das Tier hatte eine Leukozytose und zeigte ein stark gestörtes Allgemeinbefinden, so dass es drei Tage vor eigentlichem Schlachttermin aus Tierschutzgründen euthanasiert wurde. Die Proben wurden, wie oben bereits erläutert, entnommen und aufbereitet.

Bei den übrigen Tieren verlief der Versuch wie geplant und ohne weitere Komplikationen. Sie wurden nach Ablauf der acht Wochen geschlachtet, die Knochen wurden entnommen und mit der histologischen Aufarbeitung begonnen.

5.3 Makroskopische Ergebnisse

Bis auf ein Implantat der Gruppe P1 waren alle Implantate sichtbar. 80% Implantate standen bis zu maximal 5 mm über den Knochen hinaus. Neun Implantate ließen sich leicht bewegen, jedoch war nicht zu erkennen, ob es sich nur um den hervorstehenden Rest oder um das ganze Implantat handelte. Manche Implantate waren zwar im Implantatbett, doch nicht mehr fest mit dem Knochen verbunden. Eine Gruppenzuteilung der lockeren Implantate zeigte kein Muster (Tab. 7).

Schaf	Lokalisation	Gruppe
2520	Prox Fem re	P3
2521	Dist Hum re	C1
2523	Prox Hum li	P1
2523	Prox Fem li	P1
2523	Dist Fem re	P3
2524	Prox Fem re	C2
2527	Prox Hum re	C4
2527	Dist Hum li	C4

Tab. 7: Lockere Implantate

Die Implantate der Gruppe I3 zeigten eine oberflächliche Grünfärbung, was auf die Komponente Strontium zurückgeführt wurde.

Bei den Proben 2526 DFL, 2527 DFL und DFR waren mittelgradige Entzündungsreaktionen des umgebenden Weichteilgewebes ersichtlich. Die Implantate befanden sich jedoch unverändert stabil in korrekter Position.

5.4 Radiologische Ergebnisse

Alle Bohrlöcher befanden sich in korrekter Position. Sofern röntgendicht und sichtbar waren die Bohrlöcher vollständig mit Zement gefüllt. Die Röntgenbilder 1 Woche post OP unterschieden sich nur durch die Lagerung des Schafs bedingt von den Bildern post OP. Die Kontrastmittel der Gruppen I2 und I3 waren sowohl post OP, wie auch eine und acht Wochen post OP sichtbar. Es konnte keine Auswaschung von Kontrastmittel beobachtet werden. Außerdem sehr gut sichtbar waren die Gruppen C2 (PMMA) und C3 (chronOS). Die Gruppen P1, P2, P3 und PF waren, je nach Gehalt an chronOS, etwas dichter als Knochen

und somit noch gut sichtbar. Bei Gruppen C1, C4 und I1 konnten die Bohrlöcher aufgrund von verminderter Dichte identifiziert werden.

5.5 Histologische Ergebnisse

Die Dickschnitte wurden qualitativ, die Dünnschnitte semiquantitativ beurteilt. Die „van Kossa“-Färbung lässt neu gebildeten Knochen sehr gut erkennen, die Zellen wurden anhand der Toluidinblau- Färbung und der Gegenfärbung nach Mc Neal beurteilt.

Durch die Verwendung von Xylol bei der histologischen Aufarbeitung lösten sich große Teile des Polymers heraus, übrige Bestandteile sowie neu gebildetes Gewebe samt Matrix blieben jedoch dank der Infiltration mit MMA bestehen. Die Auswertung wurde dadurch nicht beeinflusst.

5.5.1 Histomorphometrische Ergebnisse

Die Histomorphometrie zeigt die Zusammensetzung der Komponenten Knochen, Bindegewebe und Biomaterial innerhalb der Fläche des Bohrlochs (Tab. 8).

Da sich große Anteile des Polymers bei der histologischen Aufbereitung herausgelöst hatten, erschienen die betroffenen Bohrlöcher leer. In der Vergrößerung wurde jedoch sichtbar, dass die Matrix, sowie sich im Bohrloch befindliche Bindegewebsanteile und Zellen gut fixiert und vorhanden waren. Diese wurden als Bindegewebe angefärbt. Der restliche, leere Teil des Bohrlochs wurde als Biomaterial gewertet und dem entsprechend gefärbt.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei den Parametern Knochen und Biomaterial gefunden.

5.5.1.1 Knochen

Die höchste Knochenneubildung erfolgte bei der Gruppe C3 (chronOS), gefolgt von den Gruppen P1, P2, P3 und PF. Deutlich weniger Knochen bildete sich bei den Gruppen I1, I3 und C2. Am wenigsten Knochen innerhalb des Bohrlochs wiesen die Gruppen I2, C1 und C4 auf. Gruppen mit einem hohen Anteil an chronOS zeigen deutlich höhere Werte der Knochenneubildung, als die Gruppen mit geringem Anteil an chronOS oder hohem Anteil an Polymer. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind in Tabelle 9 dargestellt.

Ein Abbau des Knochens, der eine Nekrose aufgrund von thermischen Reaktionen des Biomaterials bedeutet haben könnte, wurde nicht beobachtet.

5.5.1.2 Bindegewebe

Am meisten Bindegewebe bildete sich bei den Gruppen P1, P2, P3 und PF, wobei hier das zwischen den Knochentrabekeln befindliche Bindegewebe inbegriffen ist. Beim Anfärben des Bindegewebes konnte nicht zwischen dem das Implantat als Kapsel umgebenden Bindegewebe und dem Bindegewebe innerhalb der Knochentrabekel unterschieden werden. Diese beiden Komponenten sind jedoch unterschiedlich zu beurteilen. Während eine Bindegewebskapsel Teil einer Abwehrreaktion sein kann, kann das Bindegewebe zwischen den Knochentrabekeln oder zwischen Biomaterial und neuem Knochen als Granulationsgewebe oder Teil eines Heilungsprozesses gewertet werden. Bei den Gruppen I1, I2 und I3 befindet sich das Bindegewebe als fibröse Kapsel am Rande des Bohrlochs, das Implantat ist also von Bindegewebe umgeben. Ebenso von Bindegewebe umgeben sind die Implantate der Gruppe C1, C2 und C4, jedoch ist die Kapsel nicht durchgängig und schmaler, als bei den vorher genannten Gruppen. Es besteht Kontakt zwischen Knochen und Biomaterial. Beim Bindegewebe wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden.

5.5.1.3 Biomaterial

Der Prozentsatz an Biomaterial ist bei den Gruppen mit hohem Polymeranteil am höchsten, bei den Gruppen mit hohem chronOS-Anteil liegt der Wert deutlich niedriger. Er korreliert zur Summe der übrigen beiden Komponenten und füllt somit den Raum, der weder Bindegewebe, noch Knochen aufweist. Hohe Werte an Knochen und/oder Bindegewebe bedeuten somit niedrigere Werte an Biomaterial. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind in Tabelle 9 dargestellt.

Gruppe	Knochen%	Bindegewebe%	Biomaterial%
C1	0.8 ± 0.14	5.87 ± 4.94	93.91 ± 4.93
C2	1.05 ± 0.82	3.29 ± 2.33	95.54 ± 2.95
C3	26.74 ± 8.18	8.62 ± 3.86	64.47 ± 5.88
C4	0.53 ± 0.91	9.68 ± 7.61	89.70 ± 8.59
I1	1.07 ± 0.79	10.69 ± 5.78	87.94 ± 6.03
I2	0.12 ± 0.19	9.70 ± 6.09	90.10 ± 6.14
I3	0.74 ± 1.16	9.76 ± 10.55	89.36 ± 11.06
P1	13.20 ± 7.51	18.07 ± 11.12	67.81 ± 10.75
P2	7.87 ± 4.24	17.75 ± 9.29	74.19 ± 12.29
P3	11.31 ± 12.36	25.44 ± 17.33	62.34 ± 10.45
PF	17.37 ± 10.68	20.22 ± 9.87	61.93 ± 6.67

**Tab. 8: Zusammensetzung der Fläche innerhalb des Bohrlochs,
Mittelwerte ± Standardabweichung in %**

Overall	P-Wert	Individual/Gruppe	Gruppe	P-Wert
Knochen	0.00	C1	C3	< 0.0001
		C1	PF	0.02
		C2	C3	< 0.0001
		C2	PF	0.04
		C3	C4	< 0.0001
		C3	I1	< 0.0001
		C3	I2	< 0.0001
		C3	I3	< 0.0001
		C3	P2	0.01
		I1	PF	0.04
		I2	PF	0.02
		I3	PF	0.04

Tab. 9: Signifikante Unterschiede, Knochen

Overall	P-Wert	Individual/Gruppe	Gruppe	P-wert
Biomaterial	0.00	C1	C3	0.01
		C1	P1	0.01
		C1	P3	< 0.0001
		C1	PF	< 0.0001
		C2	C1	< 0.0001
		C2	C3	< 0.0001
		C2	P1	< 0.0001
		C2	P2	0.05
		C2	P3	< 0.0001
		C2	PF	< 0.0001
		C3	C4	0.03
		C3	I1	0.01
		C3	I2	0.01
		C3	I3	0.01
		C4	C1	0.03
		C4	P3	0.01
		C4	PF	0.01
		I1	P3	0.01
		I1	PF	0.01
		I2	P1	0.05
		I2	P3	< 0.0001
		I2	PF	< 0.0001
		I3	P3	< 0.0001
		I3	PF	< 0.0001

Tab. 10: Signifikante Unterschiede, Biomaterial

5.5.2 Qualitative und semiquantitative Auswertung

Bei der Auswertung der Zelltypen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede ersichtlich. Vergleichende Werte sind in Tabelle 11 dargestellt.

5.5.2.1 Gruppe C1

Mit 1% hatte kaum Knochenbildung stattgefunden. Die Werte für Bindegewebe lagen bei 6% die für Biomaterial bei 93%. Das Bindegewebe war in geringerer Menge, als bei den Gruppen I1-I3, am Übergang Knochen-Implantat aufzufinden, die fibröse Membran war jedoch mit ca. 0,2 mm dünner und meist nicht durchgehend (Abb. 19). An manchen Stellen war ein Kontakt zwischen Knochen und Implantat zu erkennen.

5.5.2.2 Gruppe C2

Bei der Gruppe C2 lag die Knochenneubildung bei 1%. Diese Gruppe zeigte mit 3% die niedrigsten Werte an Bindegewebe auf, das Biomaterial stellte 96% der Fläche dar. Das Implantat lag meist ohne fibrösen Übergang direkt dem Knochen an. Diese Gruppe zeigte die geringsten Zellreaktionen, sichtbar war nur eine geringe Anzahl an Makrophagen (Abb. 20).

5.5.2.3 Gruppe C3

Die Gruppe C3 zeigte mit $\pm 26\%$ die höchste Knochenneubildung. Das Bindegewebe (9%) lag spangenförmig zwischen neu gebildetem Knochen und Biomaterial (64%) (Abb. 21).

Auffällig war eine große Anzahl an Makrophagen, während die anderen bewerteten Zelltypen nur in geringem Masse auftraten.

5.5.2.4 Gruppe C4

Der Wert für Knochenneubildung betrug 1%, der Anteil an Bindegewebe 10%, der für Biomaterial 89%. Das histologische Bild stimmte mit dem der Gruppe C1 überein (Abb. 22).

5.5.2.5 Gruppe I1

Der das Implantat umgebende Knochen war ruhig, Knochenneubildung fand mit nur 1% minimal statt. Der Anteil an Bindegewebe betrug 11%, der für Biomaterial 90%. Um das Implantat hatte sich eine schmale, ca. 0.4 mm breite fibröse Membran gebildet, die nicht immer durchgehend zu verfolgen ist. Mit Material gefüllte Makrophagen, wenige Osteoklasten, vereinzelte Fremdkörperriesenzellen und Gefäßeinsprossung in das Bindegewebe waren sichtbar (Abb. 23, 24).

5.5.2.6 Gruppe I2

Der Wert für Knochenneubildung betrug 0,1%, der für Bindegewebe 9%, der für Biomaterial 90%.

Das histologische Bild entsprach bis auf wenige Unterschiede dem der Gruppe I1. Diese fanden sich in der Breite der fibrösen Membran, die zwischen Knochen und Implantat lag (Abb. 25). Sie betrug hier ca. 0,3 mm. Die Membran ist ebenso nicht in allen Fällen durchgehend. Die Anzahl der Makrophagen ist höher als in Gruppe I1, auch fanden sich mehr Gefäße innerhalb des Bindegewebes.

5.5.2.7 Gruppe I3

Der Wert für Knochenneubildung betrug 1%, der für Bindegewebe 10%, der für Biomaterial 89%.

Das histologische Bild stimmte bis auf eine leichte Erhöhung der Makrophagen, Lymphozyten, und Plasmazellen mit denen von Gruppe I2 überein. Die fibröse Membran war ebenfalls ca. 0,3 mm breit (Abb. 26).

5.5.2.8 Gruppe P1

Mit 13% fand hier eine deutlich höhere Knochenneubildung statt (Abb. 27). Der Anteil an Bindegewebe betrug 18%, das Bindegewebe durchzog das Implantat und bildete eine spangenförmige Struktur. Zwischen diesen Spangen fanden sich Biomaterial (68%) und Inseln neu gebildeten Knochens. Das Biomaterial lag direkt dem Knochen an. Bei dieser Gruppe waren vergleichend mit den anderen Putty-Gruppen am meisten Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten, Makrophagen und Gefäße sichtbar. Die Werte für die genannten Parameter waren deutlich höher, als die der injizierbaren Gruppen. Es fehlt jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zu den anderen Materialien.

5.5.2.9 Gruppe P2

Die Knochenneubildung betrug 8%, der Anteil an Bindegewebe 18%, der für Biomaterial 74%. Das histologische Bild ähnelte dem der Gruppe P1 (Abb. 28). Das Bindegewebe bildete eine spangenförmige Struktur um Biomaterial und Inseln neuen Knochengewebes. Unterschiede lagen in einer geringfügig kleineren Anzahl an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen.

5.5.2.10 Gruppe P3

Die Knochenneubildung betrug 11%, der Anteil an Bindegewebe 25%, der für Biomaterial 62%. Das Bild der Gruppe P3 entsprach abgesehen von einer kleineren Anzahl an Lymphozyten dem der Gruppe P2 (Abb. 29).

5.5.2.11 Gruppe PF

Die Gruppe PF wies mit $\pm 17\%$ nach der Kontrollgruppe C3 die höchsten Werte für Knochenneubildung auf. Der Anteil an Bindegewebe betrug 20%, der für Biomaterial 62%. Die Dünnschnitte dieser Gruppe zeigten die größte Anzahl an Osteoklasten, Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen und Lymphozyten (Abb. 30).

	Makrophagen	Plasmazellen	Lymphozyten	FBC	Osteoklasten	Gefäße
C1	1.7	0.3	1.3	0.3	0	2.7
C2	1.2	0.2	0.8	0	0.5	0.8
C3	4.0	0.2	1.0	0.2	0.2	2.3
C4	2.8	0.8	1.3	0.5	0.8	2.5
I1	1.5	0.3	1.5	0.7	0.5	2.0
I2	2.0	0.7	1.7	0.8	0.7	3.2
I3	3.2	1.3	2.0	0.2	0.2	3.2
P1	4.2	0	2.2	2.4	0.4	3.2
P2	3.5	0.3	2.2	1.2	0.7	2.7
P3	3.3	0.5	1.5	1.5	0.5	2.5
PF	4.5	1.3	2.0	1.7	1.2	2.3

**Tab. 11: Mittelwerte der semiquantitativen Auswertung der Zellen;
je höher der Score, desto höher die Anzahl an Zellen (siehe Tab. 4, 5)**

5.5.3 Korrelationen

Bei der Auswertung fanden sich einige statistisch signifikante Korrelationen. Die Menge an Biomaterial wies mit einem P-Wert von < 0.0001 eine negative Korrelation zur Menge an Knochen auf. Ebenso korrelierten Bindegewebe und Biomaterial negativ mit einem P-Wert von < 0.0001 miteinander, wobei hier wiederum die Lokalisation des Bindegewebes beachtet werden musste (siehe 3.5.1.2). Beim Knochen fand sich außerdem eine positive Korrelation zur Anzahl an Makrophagen ($p = 0.04$).

Beim Bindegewebe bestanden Korrelationen zu Makrophagen ($p = 0.01$), Lymphozyten ($p = 0.04$), und Fremdkörperriesenzellen ($p < 0.0001$).

Das Biomaterial korrelierte negativ zu Anzahl an Makrophagen ($p = 0.001$) und Fremdkörperriesenzellen ($p < 0.0001$).

Bei den Zellen untereinander fanden sich folgende positive Korrelationen:

- Makrophagen zu Plasmazellen ($p = 0.04$), Lymphozyten ($p = 0.01$), Fremdkörperriesenzellen ($p = 0.001$) und Gefäßen ($p = 0.03$)
- Lymphozyten zu Plasmazellen ($p = 0.001$), Fremdkörperriesenzellen ($p = 0.01$) und Gefäßen ($p < 0.0001$)
- Fremdkörperriesenzellen zu Osteoklasten ($p = 0.02$) und Gefäßen ($p = 0.01$)

6 Diskussion

In der vorliegenden Studie sollten neue Komposite auf Biokompatibilität, Abbaurate, Osteokonduktivität, Osteointegration und Handhabung im Vergleich zu bisher verwendeten Biomaterialien getestet werden. Die Biokompatibilität wurde mit Hilfe von klinischen Untersuchungen, makroskopischen Ergebnissen nach der Schlachtung und der Histologie beurteilt. Alle Gruppen bis auf Gruppe I3 zeigten eine gute Biokompatibilität. Da die Grenze zur Fremdkörperreaktion nicht fest definiert ist, war eine Beurteilung der Gruppe I3 schwierig. Die Ergebnisse unterschieden sich nur geringfügig von denen der anderen Gruppe, sie kamen einer Fremdkörperreaktion aber am nächsten.

Weiterhin sollten die Auswirkungen von Kontrastmittel, sowie deren radiologische Nachweisbarkeit untersucht werden. Die Kontrastmittel waren nach zwei Monaten noch mit gleicher Röntgendichte vorhanden, wie zu Beginn. Ob Strontiumcarbonat Auslöser der vermehrt vorgefundenen Abwehrzellen der Gruppe I3 ist, bleibt ungeklärt.

6.1 Versuchsmodell

Aus ethischen Gründen sollten Tierversuche an phylogenetisch möglichst tief stehenden Individuen durchgeführt werden. So können für anfängliche Versuche zum Beispiel kleine Nager herangezogen werden, die insgesamt wesentlich kostengünstiger sind, als Schafe. In einer weiter fortgeschrittenen Versuchphase sollten die Ähnlichkeiten bezüglich Gewicht, Knochenstruktur, -heilung und Knochenstoffwechsel berücksichtigt werden, welche zwischen Mensch und Schaf relativ groß sind⁵⁴. Schafe eignen sich für Versuche des Bewegungsapparates, da sie artgerecht gehalten werden können und im Falle des „Drill hole models“ Unterschiede von Materialien sowohl zwischen den Lokalisationen innerhalb des gleichen Tieres, als auch zwischen verschiedenen Individuen untersucht werden können. Für den Versuch wurden adulte, männliche Schafe zwischen zwei und drei Jahren gewählt. Um die Tierzahl möglichst gering zu halten, wurden die Schafe an acht unterschiedlichen Lokalisationen operiert, was die Verwendung von bis zu acht verschiedenen Kompositionen pro Schaf ermöglichte. Das „Drill hole model“ hat sich in den letzten Jahren in zahlreichen Versuchen bewährt, in denen Biokompatibilität, Bioaktivität, Biodegradation und andere Faktoren untersucht wurden^{38,52,53,55-57}. Bei korrekter Positionierung der Bohrlöcher ist die Komplikationsrate bezüglich dem Auftreten von Frakturen sehr niedrig⁵³. Der Zeitraum von acht Wochen wurde gewählt, da eine Vorselektion der Gruppen getroffen werden soll, mit denen dann längere Versuche durchgeführt werden sollen.

6.2 Auswertungsmethoden

Die unmittelbar nach der OP aufgenommenen Röntgenbilder waren von guter Qualität und dienten wie oben bereits erwähnt der Überprüfung der Lokalisation der Bohrlöcher mit Implantat. Die eine Woche nach der OP aufgenommenen Röntgenbilder brachten keine weiteren Aufschlüsse. Die Kontrastmittel waren unverändert sichtbar. Die Röntgenbilder nach der Schlachtung dienten der Dokumentation und wurden nicht zur Auswertung herangezogen, da sich die Mikroradiographien und die histomorphometrische Messung besser zur Beurteilung der Knochenneubildung und des Knochenumbaus eigneten.

Zur histologischen Untersuchung wurden Dick- und Dünnschnitte herangezogen. Die Oberflächenfärbung der Dickschnitte mit Toluidinblau eignete sich gut zur Beurteilung der Zusammensetzung der Bohrlöcher. Bei der computergestützten Bildanalyse ergab sich das Problem, dass Bindegewebe und Biomaterial an wenigen Stellen den gleichen Farbton aufwiesen, was eine Unterscheidung nicht möglich machte. Es handelte sich jedoch pro Bild nur um wenige Pixel. Der Einfluss auf die Ergebnisse war minimal und wurde daher nicht weiter beachtet.

Die mit Toluidinblau gefärbten Dünnschnitte wurden zur semiquantitativen Analyse herangezogen. Die Gesichtsfelder wurden möglichst repräsentativ gewählt (siehe 2.8.3). Zur qualitativen Auswertung wurden sowohl die Dickschnitte, als auch beide Färbungen der Dünnschnitte herangezogen.

Die Statistik wurde mit dem Computerprogramm SPSS Version 13.0 erstellt. Bei der Auswertung der Zelltypen ergaben sich insgesamt wenige Unterschiede, die nicht statistisch signifikant waren. Um deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen herauszuarbeiten, hätte man die Tierzahl erhöhen müssen, wovon aus Gründen des Tierschutzes jedoch abzusehen ist. Da alle Materialien eine gute Biokompatibilität aufwiesen, schien diese Tierzahlerhöhung nicht angebracht zu sein.

Die Ergebnisse des während des Versuchs erkrankten Schafes 2523 wurden zur Auswertung herangezogen, da sie sich im Durchschnitt nicht von denen der anderen Implantate der jeweiligen Gruppe unterschieden.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Operation

In der Handhabung waren alle Zementformulierungen zufrieden stellend. Die Gruppen C1, I2, I3 und P2 wurden als besonders positiv und benutzerfreundlich empfunden. Der Beurteilung der Handhabung ist anzukreiden, dass sie durch nur einen Chirurgen vorgenommen werden konnte und somit einem gewissen subjektiven Einfluss unterliegt. Allerdings entspricht das der klinischen Realität. Ein Material wird in der Praxis nach der Benutzerfreundlichkeit, beurteilt, so dass dieser subjektiven Bewertung doch eine verkaufstechnisch wichtige Bedeutung zukommt.

6.3.2 Postoperative Phase

Bei den klinischen Untersuchungen waren bei allen Tieren nach der OP auftretende Umfangsvermehrungen im Wundbereich sichtbar. Ursache dieser Schwellungen, die nach Punktion als Serome eingeschätzt wurden, könnte eine durch den chirurgischen Eingriff und die Weichteilpräparation ausgelöste Wundreaktion sein. Die Schwellungen gingen nach spätestens fünf Tagen vorüber, was die Vermutung einer Reaktion auf das chirurgische Trauma bestärkte. Schon in anderen Drillhole-Studien wurde von nach der OP auftretenden Seromen berichtet, die nach wenigen Tagen wieder verschwanden⁵². Eine weitere Ursache der Serome könnte das Herausstehen der Implantate über den Kortex sein, was zu einer mechanischen Reizung der umgebenden Weichteile geführt haben könnte. Dies wurde jedoch schon in früheren Studien so gehandhabt und führte zu keinen klinischen Symptomen^{55,58}. Allerdings wurden in den früheren Studien leicht resorbierbare Kalziumphosphat-Materialien verwendet, welche wahrscheinlich schnell abgebaut wurden und nicht über die gesamte Zeitdauer von zwei Monaten den darüber gleitenden Weichteilen mechanischen Widerstand boten⁵⁵.

Die Schwellungen bei Schaf 2526 und Schaf 2527 jeweils am linken distalen Femur hatten infektiösen Charakter. Wodurch die Entzündung ausgelöst wurde, konnte nicht geklärt werden. Die beiden Implantate gehörten zu den Gruppen I3 und C2. Da es sich bei der Gruppe C2 um eine Kontrollgruppe handelt, die schon lange mit Erfolg eingesetzt wird, ist eine Fremdkörperreaktion auf das Implantat unwahrscheinlich. Auch die übrigen Implantate der beiden Gruppen zeigten keine ähnlichen Anzeichen. Als mögliche Ursache könnte eine Kontaminationsquelle während der Operation in Frage kommen. Die beiden Schafe wurden am selben Tag operiert, zu bedenken wäre ein Fehler bei der Sterilisation oder während der Operation. Allerdings ist zu bemerken, dass sich bei diesen beiden Schafen zwischen Bohrer

und Gewebeschutzhülse eine schmierige, schwarze Substanz bildete, die zwar von der Wunde ferngehalten wurde, aber dennoch eine Unverträglichkeitsreaktion ausgelöst haben könnte.

Die Flüssigkeit der Wundhöhle wurde bakteriologisch und zytologisch, sowie auch auf Metallpartikel untersucht. Die bakteriologische Untersuchung ergab keine Ergebnisse, da die Tiere bereits unter dem Antibiotikum Amoxicillin standen. Die zytologische Untersuchung zeigte eine erhöhte Zellzahl auf. Die Untersuchung auf Metallpartikel war zumindest histologisch und mit Polarisationsfilter negativ.

Die nicht infizierte Schwellung am distalen Femur rechts bei Schaf 2527 gehörte der Gruppe PF an. Auch hier kommen mehrere der oben genannten Ursachen in Frage, wie z.B. das Überstehen des Implantats über den Kortex hinaus.

6.3.3 Makroskopische Ergebnisse

Die makroskopische Untersuchung des umliegenden Gewebes und des im Knochen befindlichen Implantats zeigten bis auf die oben genannten Implantatstellen (2526, DFL; 2527, DFL und DFR) nur geringfügige Rötungen. Die stärkeren Entzündungsanzeichen der Implantate 2526, DFL; 2527, DFL und DFR lassen sich auf Infektion und wiederholten chirurgischen Eingriff mit Verwendung von Drainagen zurückführen.

Die Lockerung der Implantate (Tabelle 6) könnte ein Fülldefizit des Bohrlochs oder ein Zusammenziehen des Implantats nach vollendeter Abbindeaktion zur Ursache haben. Die Instabilität des Implantats würde zu Granulationsgewebe in Form einer bindegewebigen Kapsel führen, was vor allem bei den injizierbaren Gruppen I1-I3, C1 und C4 der Fall war. Gruppe C1 und C4 wiesen lockere Implantate auf, die übrigen Gruppen waren nicht vertreten. Ob bei den Gruppe C1 und C4 die mechanische Instabilität oder eine reduzierte Verträglichkeit zur Bildung einer Bindegewebskapsel geführt hatte, konnte anhand der makroskopischen nicht schlüssig beantwortet werden.

6.3.4 Histologische Ergebnisse

Je nach Einsatzgebiet eines Implantats ist eine mehr oder weniger schnelle Knochenneubildung erwünscht. Die in der vorliegenden Studie verwendeten neuen Kompositionen wiesen eine Knochenneubildung zwischen 0% und 17% auf. Die Gruppen I1, I2 und I3 liegen dabei mit ca. 1% Knochenneubildung deutlich unter den Gruppen P1, P2, P3 und PF mit Werten zwischen 8 und 17%. Die höheren Werte wurden, wie in früheren Studien gezeigt, auf größere Anteile von chronOS zurückgeführt. Die Knochenneubildung zeigt eine negative Korrelation zum in der jeweiligen Zementformulierung verwendeten Anteil an

Polymer. Ebenso korreliert die Menge an Biomaterial negativ zur Menge an Knochen. Dies ließe sich durch einen „schleichenden Ersatz“ von Biomaterial durch Knochen erklären⁵².

Die Bildung einer bindegewebigen Kapsel und die Zellantwort werden als Selektionsmethode zur Einschätzung der Biokompatibilität des implantierten Materials herangezogen¹³. Die Bildung einer bindegewebigen Kapsel kann jedoch nicht eindeutig als negativ angesehen werden. Sie wird von einigen Autoren auch als normale Antwort eines dynamischen Prozesses bei der Einführung fremder Materialien betrachtet^{8,9}.

Bei den Gruppen I1, I2, I3, C1 und C4 waren Anzeichen einer bindegewebigen Kapsel vorhanden. Die Gruppen P1-P3 und PF wiesen in der histomorphometrischen Auswertung höhere Werte an Bindegewebe auf als die vorher genannten. Die Verteilung des Bindegewebes zwischen den neu gebildeten Knochentrabekeln und entlang vom Biomaterial vorgegebener Spangenstrukturen deutet auf ein positives Geschehen hin, da sie Teil eines Heilungs- und nicht eines Abwehrprozesses sein können. Auch könnte es lediglich die Folge von kleinen Bewegungen zwischen Implantat und Knochen sein (micromotion), was durch unterschiedliche Steifigkeit der beiden Oberflächen zu erklären wäre. Die Gruppen C2 und C3 hatten niedrige Werte an Bindegewebe und keine Anzeichen einer Unverträglichkeitsreaktion in Form einer bindegewebigen Kapsel. Die bindegewebige Kapsel kann jedoch nicht als alleiniges Kriterium der Unverträglichkeit eines Materials herangezogen werden.

Zusammen mit dem Kriterium Bindegewebe sollten Anzahl und Art der Zellen betrachtet werden. Entzündungsanzeichen sind durch das Auftreten von verschiedenen Zellen, wie Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und dem Einsprossen von Gefäßen gekennzeichnet^{6,59}. Diese Zellen jedoch sind ebenso Teil eines normalen Heilungsprozesses und in jeden Fall an Abbau und Resorption von Biomaterialien beteiligt^{56,60}. Betrachtet werden sollte also die Menge der Zellen (Tab. 11) zusammen mit dem übrigen histologischen Bild. Bei der Anzahl Makrophagen zeigen die Gruppen P1, P2, P3, PF und C3 etwas höhere Werte als die übrigen. Die Gruppen P1, P3, PF und I3 sind durch das vermehrte Auftreten weiterer Abwehrzellen, wie Lymphozyten, Plasmazellen und Fremdkörperriesenzellen gekennzeichnet. Da die genannten Gruppen bis auf Gruppe I3 aber eine gute Integration im Knochen aufweisen, kann das Auftreten der Zellen als Abbaumechanismus beurteilt werden. Die Gruppe I3 lag bei Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und Gefäßen im höheren Bereich und zeigte zusätzlich eine bindegewebige Kapsel. Dieses Bild kommt einer Fremdkörperreaktion, verglichen mit den übrigen Gruppen am nächsten. Der Körper erkennt das Material als fremd, versucht es zu eliminieren oder

gegenüber seiner Umgebung abzuschotten und bildet somit ein etwas aktiveres Granulom.

Die übrigen Gruppen können als biokompatibel angesehen werden.

Weiteres Kriterium zur Beurteilung der Einsatzfähigkeit eines Biomaterials ist die klinische Indikation. Jede unterschiedliche Indikation verlangt andere, angepasste Eigenschaften.

Wichtig sind dabei die Zeiteinheit, für die das Material eine Aufgabe im Organismus übernehmen soll, die mechanische Stabilität und die Elastizität. Während das Einsatzgebiet von Biomaterial wie chronOS Auffüllung von Knochendefekten nach Trauma,

Rekonstruktion oder Korrektur bei nicht lasttragenden Indikationen umfasst, wird z.B.

PMMA zur Implantation von Endoprothesen oder zum Auffüllen von Wirbelkörpern und

damit bei lasttragenden Indikationen verwendet. Dem Vorhandensein von Bindegewebe wird je nach Indikation eine unterschiedliche Gewichtung zugeschrieben. Ein Frakturspalt muss verheilen und dauerhaft stabil bleiben, so dass Bindegewebe hier absolut unerwünscht ist.

Eine Vertebroplastik soll den Wirbel für eine gewisse Zeit stabilisieren, das Vorhandensein von Bindegewebe ist also weniger gravierend.

6.4 Schlussfolgerung und Perspektiven

In der vorliegenden Studie wurden elf verschiedene Zementformulierungen auf Biokompatibilität, Abbaurate, Osteokonduktivität, Osteointegration und Handhabung untersucht. Das „Drill hole model“ am Schaf eignete sich gut zum Austesten der neuen Kompositionen. Alle Kompositionen bis auf die Gruppe I3 zeigten eine gute Biokompatibilität. Bei der Gruppe I3 muss die Biokompatibilität in Frage gestellt werden. In der Handhabung wurden die Gruppe C1, I2, I3, und P2 mit sehr gut bewertet und überzeugten am meisten. Die weiteren Zementeigenschaften sollten in Abhängigkeit ihres Einsatzgebiets bewertet werden.

Als nächster Schritt stehen weitere Versuche mit größeren Defekten zur Testung der mechanischen Eigenschaften der neuen Kompositionen an. Die Kompositionen sollten auch in länger dauernden Versuchen erprobt werden.

Die Zukunft der Knochenersatzmaterialien könnte in der weiteren Erforschung von Kompositionen liegen, die in Bioaktivität und mechanischen Eigenschaften optimiert werden. Das ideale Komposite könnte aus einem Trägermaterial vereint mit einer biologisch wirksamen Substanz bestehen³.

7 Literaturverzeichnis

1. König F: Über die Implantation von Elfenbein zum Ersatz von Knochen- und Gelenkenden. Orthopaedics and related sciences March 18-41, 1990
2. Rueger JM: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. Orthopade 27:72-79, 1998
3. Linhart W, Peters F, Lehmann W, et al: Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. J Biomed Mater Res 54:162-171, 2001
4. von Garrel T, Gotzen L: Allogenic bone transplantation and bone banking. Unfallchirurg 101:713-727, 1998
5. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. J Appl Biomater 2:187-208, 1991
6. Neidlinger-Wilke C: Biokompatibilität von Implantatmaterialien, in Vorlesungsskript Anwendung moderner Erkenntnisse der Biomechanik für die Behandlung von Orthopädischen und Unfallchirurgischen Patienten. Ulm, Universität Ulm, 2006
7. Ramakrishna S: An introduction to biocomposites. London, River Edge, NJ, Imperial College Press ; Distributed by World Scientific Pub., 2004, pp 18-33,210; 223 p.
8. Freyria AM, Chignier E, Guidollet J, et al: Peritoneal macrophage response: an in vivo model for the study of synthetic materials. Biomaterials 12:111-118, 1991
9. Tang L, Eaton JW: Inflammatory responses to biomaterials. Am J Clin Pathol 103:466-471, 1995
10. Tang L, Ugarova TP, Plow EF, et al: Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. J Clin Invest 97:1329-1334, 1996
11. Tang L, Eaton JW: Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. J Exp Med 178:2147-2156, 1993
12. Bush D, England B, Tucci M, et al: The effect of TCPL devices on tissue-implant interface analysis using adult sheep as a model. Biomed Sci Instrum 31:147-152, 1995
13. Benghuzzi H: Cytological evaluation of capsular tissue surrounding TCPL implant in adult rats. Biomed Sci Instrum 32:81-86, 1996
14. Butler K, Benghuzzi H, Bajpai P, et al: One year histopathological evaluation of fibrous tissue surrounding TCPL implants using adult rats as a model. Biomed Sci Instrum 33:233-239, 1997
15. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop Relat Res:10-27, 2000
16. Garg M, Dev G, Misra K, et al: Early biologic behavior of bone grafts. A fine needle aspiration cytology study. Acta Cytol 41:765-770, 1997
17. Barth A: Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen. Arch Klin Chir, 1893
18. Hofmann G: Allogene Knochentransplantation. Zülrich, Biermann-Verlag GmbH, 1992
19. Goldhaber P: Osteogenic induction across millipore filters in vivo. Science 133:2065-2067, 1961
20. Wirth CJ: Autologe Knochentransplantation. Gräefelfing, Demeter Verlag, 1986
21. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 37:597-599, 1988
22. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, et al: Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 326:726-732, 1992
23. Update: Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 38:37-38, 43, 1989
24. Gurtler L: Blood-borne viral infections. Blood Coagul Fibrinolysis 5 Suppl 3:S5-10; discussion S11-12, 1994

25. Habal MB, Reddi AH: Bone grafts & bone substitutes. Philadelphia, Saunders, 1992, pp xxii, 461 p.
26. Young C, Sandstedt P, Skoglund A: A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:72-76, 1999
27. Elves MW, Salama R: A study of the development of cytotoxic antibodies produced in recipients of xenografts (heterografts) of iliac bone. *J Bone Joint Surg Br* 56:331-339, 1974
28. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N: Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18:207-212, 1987
29. Brown W, Chow L: Dental restorative cement pastes, Patent Number 4518430 American Dental Association Health, 1985
30. Claes L, Hoellen I, Ignatius A: [Resorbable bone cements]. *Orthopade* 26:459-462, 1997
31. Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, et al: Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times. *J Mater Sci Mater Med* 10:223-230, 1999
32. Böhner M: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4:37-47, 2000
33. Ginebra MP, Fernandez E, De Maeyer EA, et al: Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J Dent Res* 76:905-912, 1997
34. Fernandez E, Gil FJ, Best SM, et al: Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: compressive strength and microstructural development. *J Biomed Mater Res* 41:560-567, 1998
35. Grimandi G, Weiss P, Millot F, et al: In vitro evaluation of a new injectable calcium phosphate material. *J Biomed Mater Res* 39:660-666, 1998
36. Khairoun I, Magne D, Gauthier O, et al: In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *J Biomed Mater Res* 60:633-642, 2002
37. Iwashita Y, Yamamuro T, Kasai R, et al: Osteoconduction of bioceramics in normal and osteopenic rats: comparison between bioactive and bioinert ceramics. *J Appl Biomater* 3:259-268, 1992
38. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Böhner M, et al: In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27:5186-5198, 2006
39. Böhner M: Analytical model for prediction of resorption of bone substitutes, in RMS-Bericht 2004
40. Leroux L, Hatim Z, Freche M, et al: Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 25:31S-34S, 1999
41. Wintermantel E: Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen : Implantate für Medizin und Umwelt. Berlin ; New York, Springer, 1996
42. Hollinger JO, Battistone GC: Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop Relat Res*:290-305, 1986
43. Eschbach L: Nonresorbable polymers in bone surgery. *Injury* 31 Suppl 4:22-27, 2000
44. Charnley J: Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 42-B:28-30, 1960
45. Murray DW, Carr AJ, Bulstrode CJ: Which primary total hip replacement? *J Bone Joint Surg Br* 77:520-527, 1995
46. Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, et al: In vitro evaluation of a new polymethylmethacrylate cement reinforced with hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 10:793-796, 1999

47. Chen D, Bei J, Wang S: Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. Elsevier, 2000
48. Sun H, Mei L, Song C, et al: The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* 27:1735-1740, 2006
49. Gasser B: About composite materials and their use in bone surgery. *Injury* 31 Suppl 4:48-53, 2000
50. Hench LL, Polak JM: Third-generation biomedical materials. *Science* 295:1014-1017, 2002
51. Sevostianov I, Kachanov M: Impact of the porous microstructure on the overall elastic properties of the osteonal cortical bone. *J Biomech* 33:881-888, 2000
52. Génot O: Evaluation von vier biodegradierbaren, injizierbaren Knochenzementen in einer experimentellen Studie in Schafen, Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich, 2006, p 69
53. Nuss KM, Auer JA, Boos A, et al: An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord* 7:67, 2006
54. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65, 1998
55. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, et al: In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 25:1439-1451, 2004
56. Oberle A, Theiss F, Böhner M, et al: [Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 147:482-490, 2005
57. Kemper M: Screening of fibrin and synthetic hydrogel matrices as a carrier for releasing bone morphogenetic protein, transforming growth factor beta and parathyroid hormone improving fracture healing, Pferdeklinik Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Zürich, 2003
58. Theiss F, Apelt D, Brand B, et al: Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26:4383-4394, 2005
59. Meachim G, Brooke G, Pedley RB: The tissue response to acrylic particles implanted in animal muscle. *Biomaterials* 3:213-219, 1982
60. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, et al: Macrophage activation results in bone resorption. *Clin Orthop Relat Res*:7-15, 1998

8 Abkürzungen

β -TCP	β -Trikalziumphosphat
chronOS	Knochenersatzmaterial, das aus β -Trikalziumphosphat
dist.	distal
DFL	distaler Femur links
Fem.	Femur
Hum.	Humerus
li	links
prox.	proximal
re	rechts
MMA	Methylmethacrylat
PHR	proximaler Humerus rechts
PMMA	Polymethylmethacrylat

9 Anhang

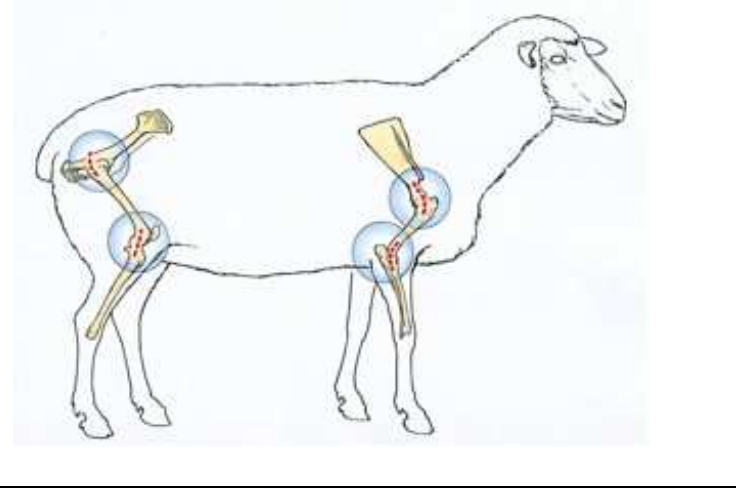
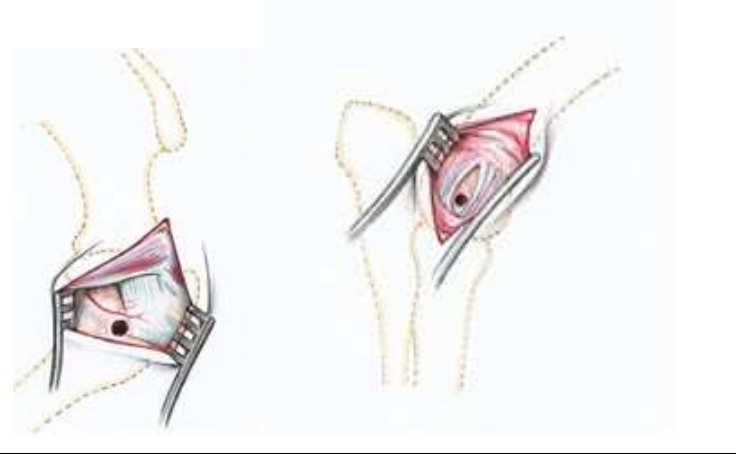
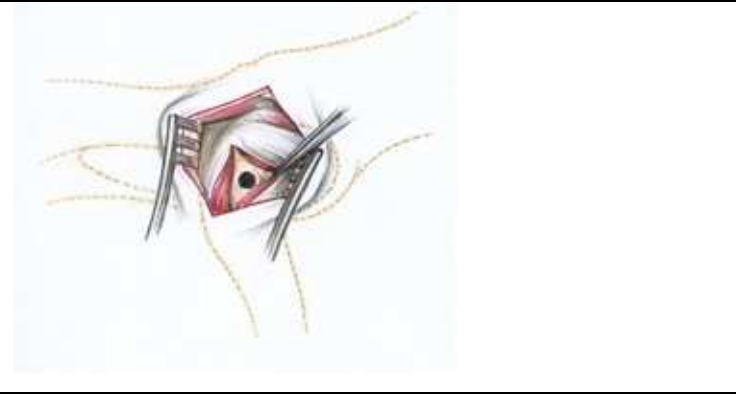
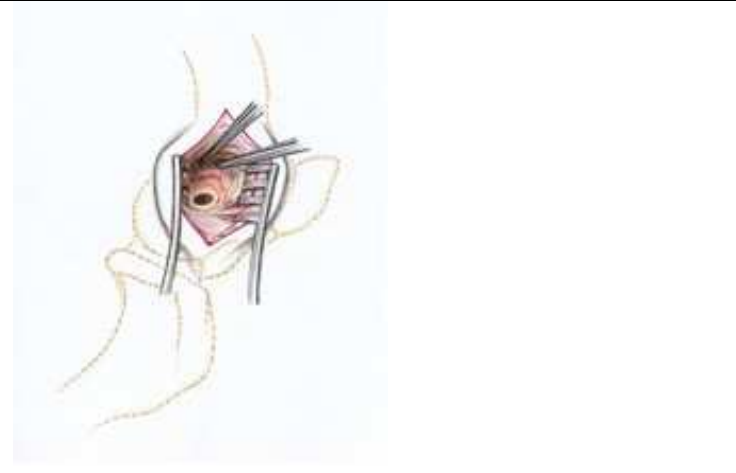
 A line drawing of a cow in profile, facing right. Two hindquarters are highlighted with blue circles. Inside each circle, a yellow bone is shown with red dots indicating the locations of drill holes for bone grafting. A yellow cone-shaped object is shown above the right hindquarter, likely representing a bone graft.	<p>Abb. 1: Bohrlochlokalisationen</p>
 Two anatomical diagrams of a humerus. The left diagram shows a proximal approach with a triangular incision and a bone graft being inserted. The right diagram shows a distal approach with a larger incision and a bone graft being inserted.	<p>Abb. 2: Zugänge proximaler und distaler Humerus</p>
 An anatomical diagram of a femur showing a proximal surgical approach. A triangular incision is made, and a bone graft is being inserted into the proximal end of the bone.	<p>Abb. 3: Zugang proximaler Femur</p>
 An anatomical diagram of a femur showing a distal surgical approach. A larger incision is made, and a bone graft is being inserted into the distal end of the bone.	<p>Abb. 4: Zugang distaler Femur</p>



Abb. 5: Injektionspistole zur Applikation der Gruppen I1-I3, C1



Abb. 6: Implantat der Gruppe P1 im Wasserbad



Abb. 7: Wasserbad zum Erwärmen der Gruppen P1-P3



Abb. 8: chronOS Granulat

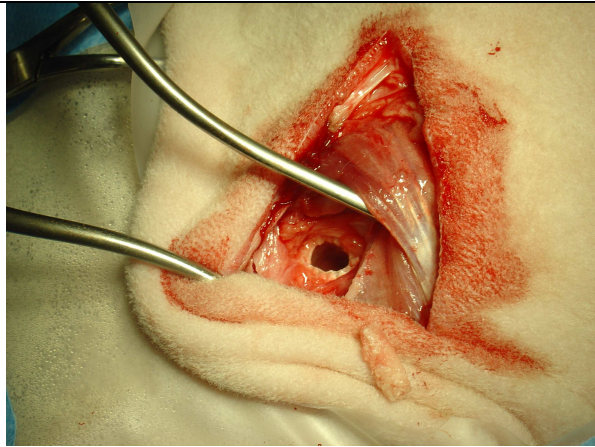


Abb. 9: 8mm Bohrloch vor dem Einbringen des Implantats



Abb. 10: 8mm Bohrer, Bohrschutzhülse

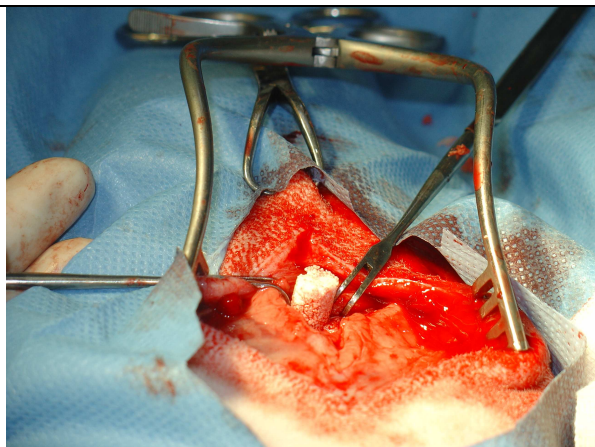
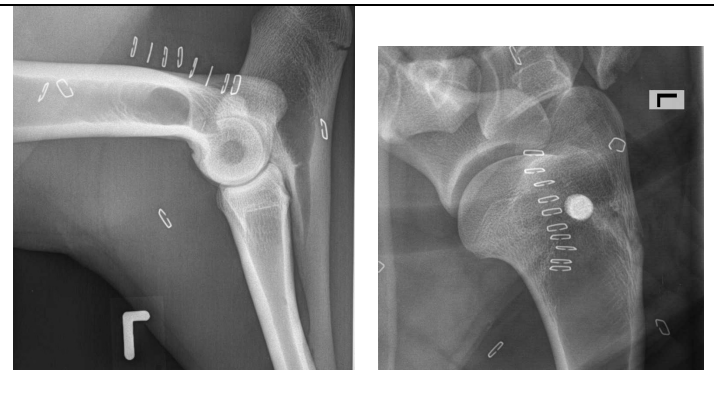
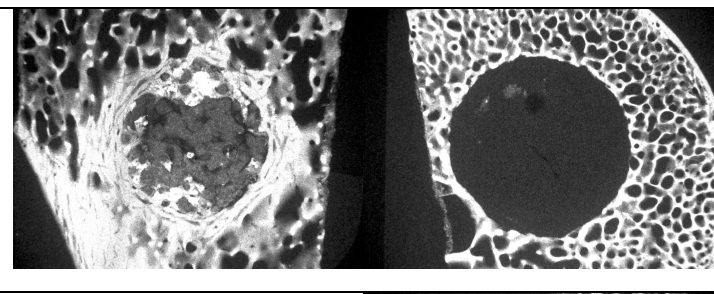
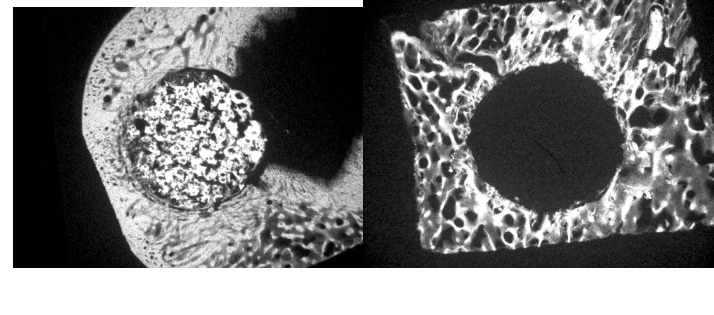
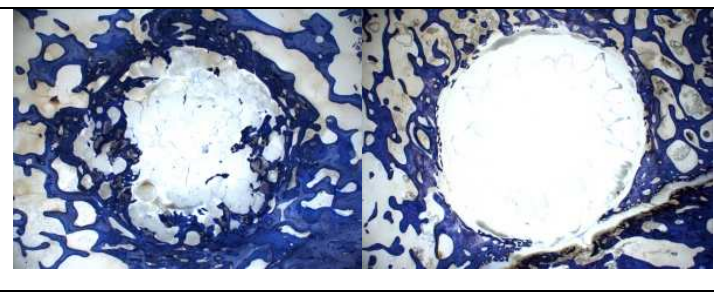
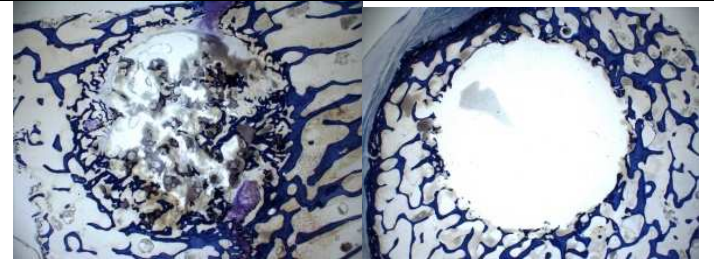
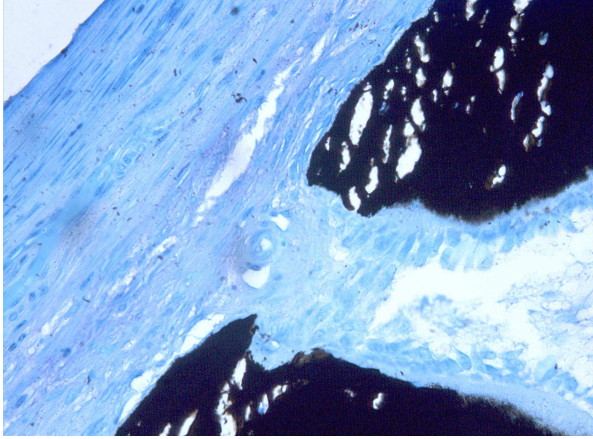
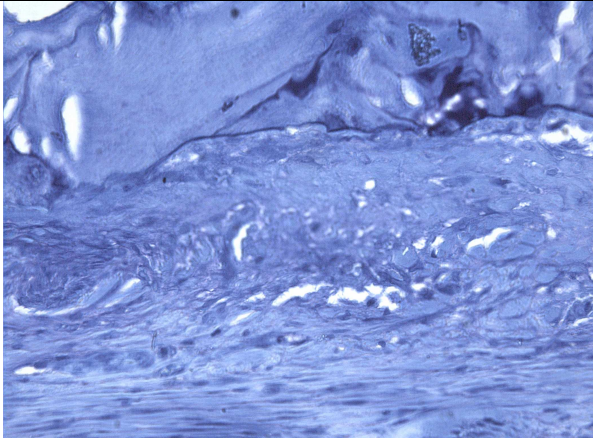
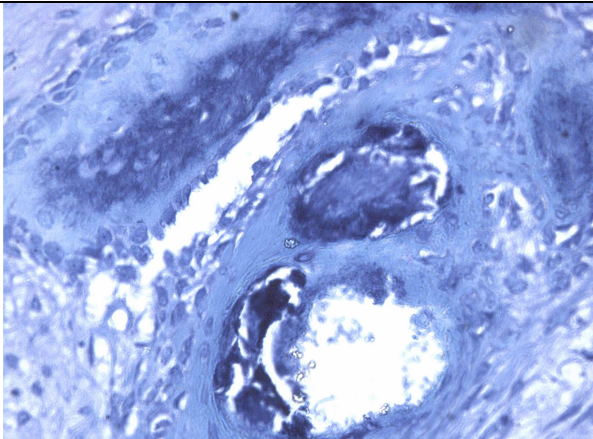
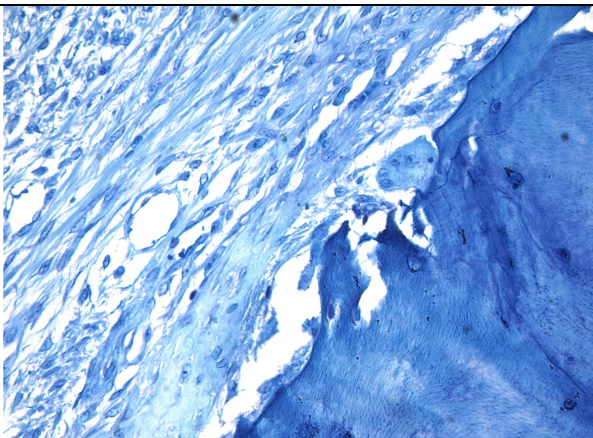


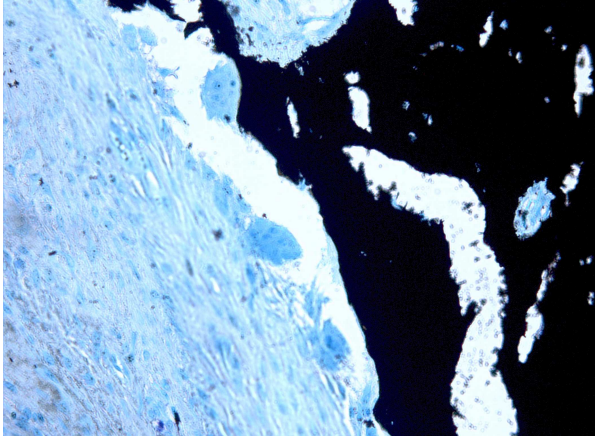
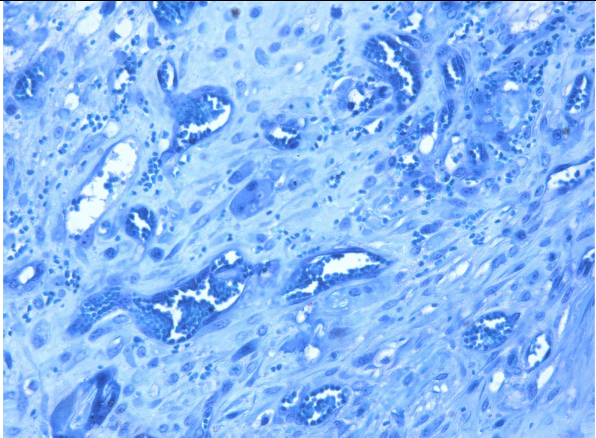
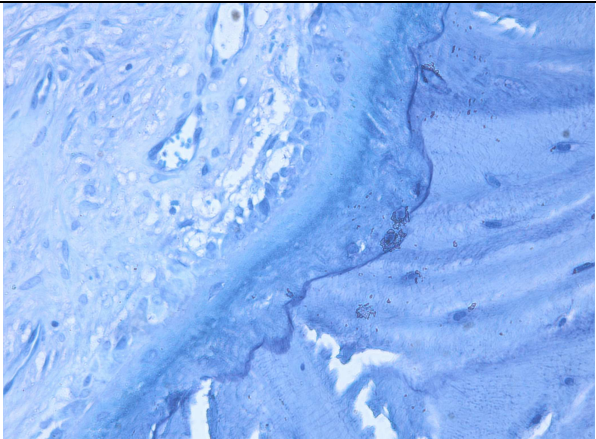
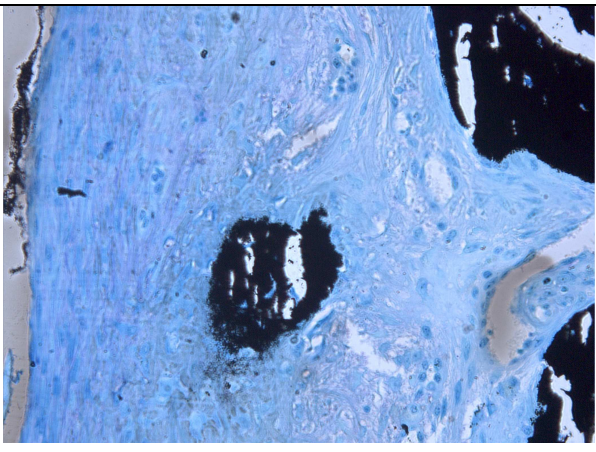
Abb. 11: Einbringen des Implantats in das Bohrloch Gruppe PF

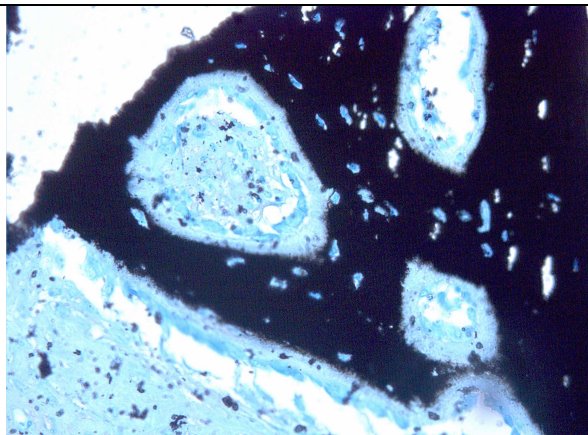
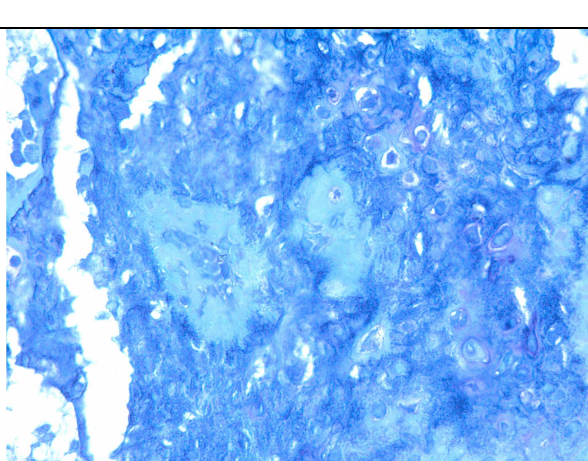
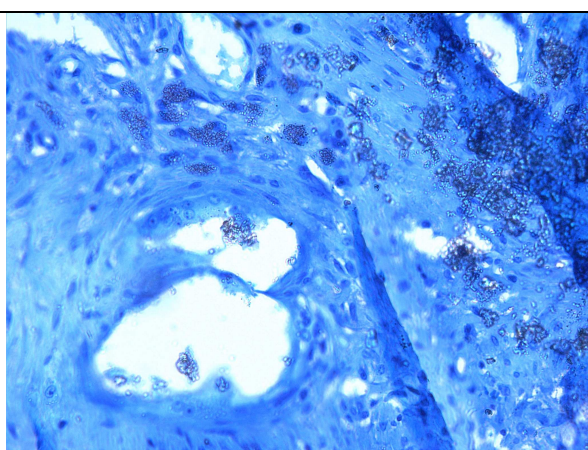
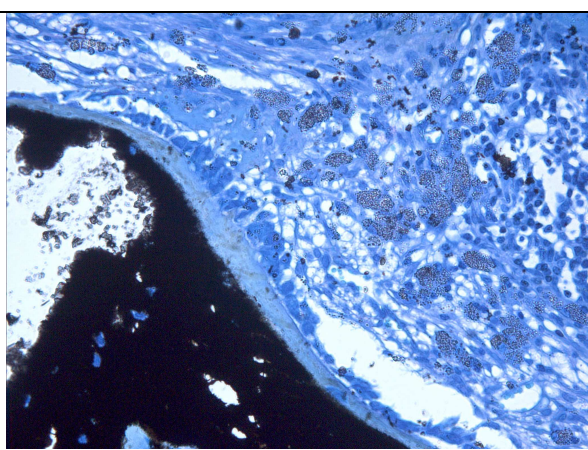


Abb. 12: Applikation der Gruppe C2 (PMMA)

	<p>Abb. 13: medio-laterale Röntgenaufnahme von Ellbogen und Schulter post OP, links: Gruppe C1, rechts Gruppe I3</p>
	<p>Abb. 14: Mikroradiographie, links: Gruppe PF, rechts: Gruppe I3, 8 Wochen post OP</p>
	<p>Abb. 15: Mikroradiographie, links: Gruppe P2, rechts: Gruppe C2, 8 Wochen post OP</p>
	<p>Abb. 17: Dickschnitte der Gruppen PF und I3</p>
	<p>Abb.18: Dickschnitte der Gruppen P2 und C2</p>

	<p>Abb. 19: Übergang Knochen zu Bindegewebe am Rand des Bohrlochs, Osteoblasten, Gruppe C1, Färbung: van Kossa, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 20: Übergang Knochen zu Bindegewebe am Rand des Bohrlochs, Gruppe C2, Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 21: Knochenneubildung, Bindegewebe, Gruppe C3, , Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 22: Übergang Knochen zu Bindegewebe am Rand des Bohrlochs, Osteoklasten, Gruppe C4, Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>

	<p>Abb. 23: Übergang Knochen zu Bindegewebe am Rand des Bohrlochs, Osteoklasten, Gruppe I1, Färbung: van Kossa, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 24: Gefäßreiches Bindegewebe innerhalb des Bohrlochs, Gruppe I1, Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 25: Übergang Knochen zu Bindegewebe am Rand des Bohrlochs, Gruppe I2, Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 26: Bindegewebe am Rand des Bohrlochs, Knochenneubildung, Gruppe I3, Färbung: van Kossa, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>

	<p>Abb. 27: Neu gebildeter Knochen, Gruppe P1, Färbung: van Kossa, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 28: Bildung von Osteoid, Gruppe P2, Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 29: Fremdkörperriesenzelle, Bindegewebe, Makrophagen, Reste von Biomaterial, Gruppe P3, Färbung: Toluidinblau, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>
	<p>Abb. 30: Neu gebildeter Knochen mit Osteoblastensaum, Makrophagen, die Biomaterial abtransportieren, Gruppe PF, Färbung: van Kossa, aufgenommen bei 2000-facher Vergrößerung</p>

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Brigitte von Rechenberg für die Überlassung des Themas, die hervorragende Zusammenarbeit, sowie die fachliche und menschliche Unterstützung, die mich so manches gelehrt hat.

Ein großes Dankeschön auch an den Korreferent Prof. Dr. Hans Geyer für Korrektur und Anregungen.

Den Projektpartnern von Synthes USA, Sean Kerr, Ali Recber und Marc Fulmer danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank an das Anästhesie-Team und das gesamte Team der Rinderklinik, ohne die die Durchführung der Operationen nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Katja Nuss für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung des Projektes.

Dem Ehepaar Rösli und Gottfried Knüsel, sowie ihren Mitarbeitern für die Betreuung der Schafe.

Dr. Monika Hilbe, Kati Zlinsky, und Sabina Wunderlin ein Dankeschön für geduldige Einweisung und Hilfe bei der Histologie.

Dem MSRU-Team Sabine, Katrin, Oliver, Niels, Alex, Jens, Olli, Michaela, Tanja, Corinne, Dinah, Karina, Inga, Birte, Kiki, Silvie, Käthi, Inka, Sandra und Roland ein besonderer Dank für ein wertvolles Jahr in der MSRU.

Mein Dank geht außerdem an Franzi und all meine Freunde, die mich bis hierhin begleitet haben.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und Rinaldo danke ich von Herzen dafür, dass sie mir in allen Lebenslagen beistehen und mich stets unterstützen.

Lebenslauf

Name	Karolin Melanie Kühn
Geburtstag	20.04.1979
Geburtsort	Heidelberg, Deutschland
Nationalität	Deutsch
1985 - 1989	Tiefburg-Grundschule Heidelberg
1989 - 1998	Kurfürst-Friedrich-Gymnasium Heidelberg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Sep. 2000 - Aug. 2001	Studium an der Szent-Istvan-University Budapest, Ungarn
Sep. 2001-Feb. 2006	Studium an der Ludwig-Maximilian-Universität München
Sommersemester 2004	Erasmusaustausch mit der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, Schweiz
Feb. 2006	Erfolgreicher Abschluss der Tierärztlichen Prüfung
März 2006	Approbation als Tierärztin
März 2006 –März 2007	Mitarbeit in der MSRU, Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich. Dissertation bei PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, ECVS, Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, MSRU
Seit April 2007	Internship am Tierspital der Universität Zürich, Klinik für Kleintierchirurgie